

Université de Montréal

**Impact de la thérapie photodynamique sur les populations lymphocytaires pouvant être impliquées dans la maladie du greffon contre l'hôte.**

Par

Lynn Jaafar

Département de médecine

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de

**Maîtrise ès sciences (M.Sc.)**

Avril 2005

© Lynn Jaafar, 2005



W

4

U58

2006

V. 121

W  
4  
U58  
2006  
V. 121

W  
4  
U58  
2006  
V. 121

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Impact de la thérapie photodynamique sur les populations lymphocytaires  
pouvant être impliquées dans la maladie du greffon contre l'hôte.**

Présenté par :

Lynn Jaafar

*a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :*

*PRÉSIDENT DU JURY : DR. LAMBERT BUSQUE*

*DIRECTEUR DE RECHERCHE : DR. DENIS-CLAUDE ROY*

*MEMBRE DU JURY : DR. BERNARD LESPÉRENCE*

## SOMMAIRE

La thérapie photodynamique (PDT) représente une modalité de prévention et de traitement de plusieurs maladies néoplasiques et immunologiques, dont la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que la PDT élimine efficacement les lymphocytes T activés. Comme nous ne pouvons restreindre l'effet de la PDT à son impact sur les cellules T activées, nous avons voulu déterminer comment la PDT agissait sur les autres lignées cellulaires: B, NK, T au repos et les cellules T régulatrices (T reg). Nous avons aussi déterminé les mécanismes de la mort de ces différentes populations cellulaires. Nous avons évalué l'effet de la PDT dans les conditions préétablies qui permettent de prévenir la GVHD dans un modèle murin incompatible au niveau du CMH. L'application de ces conditions sur des splénocytes activés avec la concanavaline A et en culture lymphocytaire mixte démontre que la PDT induit une cytotoxicité préférentielle contre les cellules T activées et que cet effet augmente en fonction du temps post-PDT. La PDT élimine non seulement environ 96% des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activés, mais près de 90% des cellules NK activées en 24 h après le traitement. Nous avons démontré que les cellules B sont aussi extrêmement sensibles à la PDT, avec une éradication de 99% des lymphocytes B dans l'heure qui suit le traitement. De façon intéressante, nous avons démontré que les cellules T régulatrices sont épargnées par ce traitement. La PDT induit principalement la mort cellulaire par des voies de nécrose, alors que les lymphocytes T activés s'adjoignent des mécanismes apoptotiques. Lorsqu'utilisée à de faibles doses, la PDT élimine efficacement les cellules T activées, mais au prix d'une perte de la sélectivité face aux lymphocytes T au repos, et en impliquant surtout des mécanismes de mort par nécrose. Ces travaux offrent des pistes importantes pour investiguer les voies utilisées par la PDT pour la prévention et le traitement de la GVHD et pour optimiser son effet sur les populations cellulaires impliquées.

*Mots clés :* Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Thérapie photodynamique (PDT). Cellules T alloréactives. Cellules T régulatrices. Greffe de cellules souches hématopoïétiques.

## ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an interesting therapeutic modality for several malignant and immunologic disorders. Studies performed in our laboratory have shown that PDT is particularly efficient against activated T cells involved in graft versus host disease (GVHD). Since the effect of PDT may not be limited to activated T cells, we studied its effect on other cell lines such as B lymphocytes, NK cells, resting T lymphocytes and regulatory T cells. The death mechanisms of the different cell populations following PDT has also been determined. We evaluated the PDT effect with pre-established conditions known to be effective for the prevention of GVHD in a MHC incompatible mouse model. The application of those conditions on concanavalin A and mixed lymphocytes reaction activated splenocytes showed that PDT induced preferential cytotoxicity against activated T cells and that the effect increased with time after treatment. PDT eliminated approximately 96% of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes and 90% of activated NK cells at 24 h post-treatment. We have also demonstrated that B cells are also extremely sensitive to PDT. Indeed, we found that 99% of B lymphocytes were eliminated 1 h after the treatment. Interestingly, our results show that regulatory T cells are spared by PDT. TH9402 induced cell death mainly by necrotic pathways. However, additional apoptotic mechanisms have also been identified in activated T lymphocytes. At lower doses of TH9402, PDT effectively eliminated activated T cells, yet this was achieved at the expense of a loss in selectivity against resting T cells, and involved mostly necrosis. This work provides important insights to develop efficient PDT strategies for the prevention and treatment of GVHD, and to optimize its effect on the different cell populations implicated.

*Key words:* Graft versus host disease (GVHD). Photodynamic therapy (PDT). Alloreactive T cells. Regulatory T cells. Hematopoietic stem cells graft.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire en français.....	iii
Sommaire en anglais.....	iv
Tables des matières.....	v
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xiii
Dédicace.....	xv
Remerciement.....	xvi
 <b>Première partie : INTRODUCTION.....</b>	 <b>1</b>
 <b>1. La Thérapie photodynamique (PDT).....</b>	 <b>2</b>
1.1. Définition.....	2
1.2. Mécanisme d'action de la PDT.....	3
1.3. Facteurs influençant la réponse des cellules à la PDT.....	4
1.4. Profil de distribution cellulaire des agents photosensibles.....	5
1.4.1. Ciblage des mitochondries.....	5
1.4.2. Ciblage des membranes.....	6
1.4.3. Ciblage des lysosomes.....	6
1.4.4. Redistribution des agents photosensibles.....	6
1.5. Voies de signalisations induites par la PDT.....	7
1.5.1. Définition apoptose <i>versus</i> nécrose.....	7
1.5.2. La voie apoptotique.....	8
1.5.3. Régulation de l'apoptose par la PDT.....	8
1.5.4. Induction de la nécrose par la PDT.....	9
1.5.5. La PDT induit-elle l'apoptose ou la nécrose des cellules cibles?.....	10
 <b>2. Greffe de moelle osseuse (GMO) et système immunitaire.....</b>	 <b>11</b>
2.1. Introduction.....	11

2.2. Type de greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH).....	12
2.2.1 GCSH autologue.....	12
2.2.2. GCSH syngénique.....	13
2.2.3. GCSH allogénique.....	13
2.3. Sources de greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	14
2.4. Complications due à la greffe de moelle osseuse.....	15
<b>3. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).....</b>	<b>16</b>
3.1. La GVHD aigue.....	17
3.2. La GVHD chronique.....	17
3.3. Condition de la GVHD.....	18
3.4. Physiopathologie de la GVHD aigue.....	18
3.4.1. La phase afférente de la GVHD.....	18
3.4.2. La phase efférente de la maladie de GVH.....	19
<b>4. Application clinique de la PDT extracorporelle ou photophérèse extracorporelle (ECP).....</b>	<b>20</b>
4.1. Traitement et prévention des différentes maladies.....	20
4.1.1. Maladies oncologiques.....	20
4.1.2. Les maladies auto-immunes.....	20
4.1.3. Les greffes de moelle osseuse autologues.....	21
4.1.4. La transplantation.....	21
4.2. Aspects pratiques de la photophérèse extracorporelle ?.....	21
4.3. Effet immuno-modulateur de la thérapie photodynamique.....	23
<b>5. Prévention et traitement de la GVHD.....</b>	<b>24</b>
5.1. La déplétion des cellules T.....	24
5.1.1. Les désavantages de la déplétion des cellules T.....	24
5.2. Les cellules NK.....	26



5.3. Les lymphocytes T régulateurs.....	26
5.3.1. Caractéristiques des cellules T régulatrices (Treg).....	26
5.3.2. Les cellules T régulatrice dans le contrôle de la GVHD.....	26
5.4. Élimination sélective des cellules T.....	27
<b>6. La thérapie photodynamique avec le TH 9402.....</b>	<b>29</b>
6.1. Introduction.....	29
6.2. Application clinique de la PDT avec le TH9402.....	31
6.2.1. La purge <i>ex-vivo</i> dans la greffe de moelle osseuse autologue.....	31
6.2.2. Efficacité de la PDT avec le TH 9402 à éliminer les cellules immunoréactives humaines : stratégie pour traiter la GVHD ?.....	31
<b>7. Description du projet de maîtrise.....</b>	<b>32</b>
<b>Deuxième partie : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>34</b>
1. Souris.....	35
2. Préparation des splénocytes.....	35
3. Activation des splénocytes <i>in vitro</i> .....	36
4. Thérapie photodynamique. (PDT).....	37
5. Analyse immunophénotypique : cytométrie en flux.....	37
6. Effet de la PDT sur les cellules Treg.....	38
6.1. Purification des cellules CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	38
6.2. Réaction mixtes lymphocytaire et essais de prolifération.....	39
6.2.1. Déplétion des cellules T .....	39
7. Optimisation du procédé de thérapie photodynamique.....	40
8. Analyse statistique.....	41

<b>Troisième partie : RÉSULTATS.....</b>	<b>42</b>
<b>1. Effet de la thérapie photodynamique sur des splénocytes activés.....</b>	<b>43</b>
1.1. Élimination spécifique des cellules T activées par la thérapie photodynamique.....	43
1.1.1. Effet de la PDT sur les lymphocytes CD4 <sup>+</sup> activées.....	43
1.1.2. Effet de la PDT sur les cellules CD8 <sup>+</sup> activées.....	44
1.2. Effet de la PDT sur les cellules NK activées.....	44
<b>2. Effet de la PDT sur les cellules de rates non activées.....</b>	<b>49</b>
2.1. Effet de la PDT sur les lymphocytes T au repos.....	49
2.2. Élimination des cellules B par la PDT.....	49
2.3. Effet de la PDT sur les cellules NK.....	50
<b>3. Mécanismes de la mort induite par la PDT.....</b>	<b>53</b>
3.1. Mécanismes de mort des splénocytes activées.....	53
3.2. Mécanismes de mort des splénocytes non activés.....	53
<b>4. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>).....</b>	<b>58</b>
4.1. Évaluation de la fonction suppressive des cellules T régulatrices.....	58
4.2. Impact de la PDT sur les cellules T régulatrices.....	58
<b>5. Optimisation de la thérapie photodynamique.....</b>	<b>62</b>
5.1. Incorporation préférentielle du TH9402 dans les splénocytes totaux au repos et activées à la Con A.....	62
5.2. Effet de la PDT sur les cellules T activées en MLR.....	63
5.3. Variation de la concentration du TH9402.....	68
5.4. Variation du temps d'incubation.....	72

5.5. Variation de l'énergie lumineuse.....	75
5.6. Variation de la concentration cellulaire et de l'épaisseur pendant l'irradiation.....	75
<b>6. Sommaire des résultats.....</b>	<b>82</b>
<b>Quatrième partie : DISCUSSION.....</b>	<b>88</b>
<b>1. Pertinence du projet.....</b>	<b>90</b>
<b>2. Discussion des résultats.....</b>	<b>91</b>
2.1. Élimination des cellules T activées par la PDT.....	91
2.2. Élimination des cellules B et NK par la PDT.....	93
2.3. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices.....	93
<b>3. La méthodologie de PDT pourrait-elle permettre de non seulement de prévenir mais aussi de traiter la GVHD?.....</b>	<b>96</b>
<b>4. Mécanisme d'action de la thérapie photodynamique</b>	
<i>ex vivo</i> : effet immunomodulateur <i>in vivo</i> .....	98
4.1. Importance de l'apoptose.....	98
<b>5. Rétention préférentielle du TH9402.....</b>	<b>99</b>
5.1. À quoi pourrait être due la rétention préférentielle du TH9402 et quelle est l'implication de la glycoprotéine-P (Pgp)?.....	99
5.2. Est-ce que cela s'applique aux cellules T murines ?.....	99
5.3. À quoi pourrait être due la rétention préférentielle du TH9402 et quel est le rôle probable des mitochondries?.....	100
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>101</b>

<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>103</b>
------------------------	------------

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

<b>Figure 1, 2 et 3.</b> Effet de la PDT sur des splénocytes activés.....	46-48
<b>Figure 4 et 5.</b> Effet de la PDT sur les splénocytes quiescents.....	51-52
<b>Figure 6 et 7.</b> Mécanisme de la mort des cellules T activées induite par la PDT.....	55-56
<b>Figure 8.</b> Mécanisme de la mort des splénocytes quiescents induite par la PDT.....	57
<b>Figure 9.</b> Évaluation de l'effet suppressif des cellules T régulatrices (CD4+CD25+) de souris B6.....	60
<b>Figure 10.</b> Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices (CD4+CD25+) de souris B6.....	61
<b>Figure 11.</b> Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les splénocytes quiescents et les splénocytes activées à la Con A.....	64
<b>Figure 12.</b> Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les lymphocytes T CD4 au repos et activés en MLR.....	65
<b>Figure 13.</b> Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les lymphocytes T CD8 au repos et activés en MLR.....	66
<b>Figure 14.</b> Analyse de cytométrie en flux des splénocytes après traitement par PDT.....	67
<b>Figure 15.</b> Effet de la PDT sur des splénocytes quiescents utilisant de faibles doses de TH9402.....	69
<b>Figure 16.</b> Effet de la PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activées en MLR.....	70
<b>Figure 17.</b> Mécanisme de la mort induite par la PDT des cellules T CD4 et CD8 activées en MLR.....	71
<b>Figure 18.</b> Effet de nouvelles conditions de PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activés en MLR.....	73
<b>Figure 19.</b> Mécanisme de la mort induite par de nouvelles conditions de PDT des cellules T CD4 et CD8 activées en MLR.....	74
<b>Figure 20.</b> Effet de la PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.....	77

<b>Figure 21. Mécanisme de la mort induite par la PDT</b>	
des cellules T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.....	78
<b>Figure 22. Effet de nouvelles conditions de PDT sur les</b>	
lymphocytes T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.....	79
<b>Figure 23. Mécanisme de la mort induite par de nouvelles conditions</b>	
de PDT des cellules T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.....	80
<b>Figure 24. Effet de nouvelles conditions de PDT sur les lymphocytes</b>	
T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.....	81
<b>Tableau I. Effet de la PDT sur des splénocytes activés et quiescents.....</b>	<b>82</b>
<b>Tableau II. Evaluation de l'effet suppressif des cellules T régulatrices.....</b>	<b>83</b>
<b>Tableau III. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices.....</b>	<b>83</b>
<b>Tableau IV. Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les</b>	
Lymphocytes T CD4 et CD8 au repos et activés en MLR.....	84
<b>Tableau V. Variation de la concentration du TH9402.....</b>	<b>85</b>
<b>Tableau VI. Variation du temps d'incubation.....</b>	<b>86</b>
<b>Tableau VII. Variation de l'énergie lumineuse.....</b>	<b>87</b>
<b>Tableau VIII. Variation de la concentration cellulaire et de</b>	
L'épaisseur pendant l'irradiation.....	87
<b>Tableau IX. Résumé de l'effet de la PDT sur des splénocytes</b>	
activés et quiescents : élimination et mécanisme.....	89

**LISTES DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS**

$^{137}\text{Cs}$  : Césium.

$^1\text{O}_2$  : Singlet d'oxygène.

$^3\text{H}$ : Thymidine.

7-AAD : 7-atinomycine D.

8-MOP: 8-methoxypsoralen.

Ac: Anticorps.

Ag miHLA : Antigènes mineurs d'histocompatibilité.

Ag : Antigène.

ALA: "5-Aminolevulinic acid".

AnnV: Annexine V.

Apaf-1: "Apoptosis protease activating factor".

APC : Cellule présentatrice d'antigène.

ATP: Adénosine triphosphate.

BFU-E: "Blast forming unit-erythroid".

BPD-MA: "Benzoporphyrin derivative monoacid ring A".

CFU-GEMM: "Colony forming unit-granulocyte erythroid monocyte megakaryocyte".

CFU-GM: "Colony forming unit-granulocyte monocyte".

cGy : Centigray.

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

CMV : Cytomégalovirus.

Con A : Concanavalline-A.

CSH: Cellules souches hématopoïétiques.

CTCL: "Cutaneous T cell lymphoma".

CTL : "Cytotoxic T lymphocyte".

CTLP: "Cytotoxic lymphocyte precursor".

DISC: "Death induced signaling complex".

EBV: Epsein-barr virus.

ECP: Photophérèse extracorporelle ("Extracorporeal photopheresis").

Fas-L: Fas ligand.

FBS: Serum de veau fœtal ("fetal bovine serum").

GCSH : Greffe de cellules souches hématopoïétiques.  
GMO: Greffe de moelle osseuse.  
GVH: Greffon contre l'hôte ("Graft-versus-host").  
GVHD: Maladie du greffon contre l'hôte ("Graft-versus-host disease").  
GVL : "Graft versus leukemia".  
Hi : Marquage d'intensité élevée ("high").  
HLA: Antigènes Leucocytaires Humains ("Human Leukocyte Antigen").  
IFN : Interferon.  
IL-1 : Interleukine -1.  
IL-2 : Interleukine -2.  
Int : Marquage d'intensité intermédiaire ("intermediate").  
J: Joule.  
Lo : Marquage de faible intensité ("intermediate").  
LPS: Lipopolysaccharide.  
MDR: "Multi drug resistance".  
MFI: Intensité moyenne de fluorescence ("Mean fluorescence index").  
MLR: "Mixed lymphocyte reaction".  
PC4: Phtalocyanine 4.  
PDT : Thérapie photodynamique ("Photodynamic therapy").  
Pgp : Glycoprotéine P.  
PPIX : Protoporphyrine IX.  
ROS: "Reactive oxygen species".  
SCID: Immunodéficience combinée sévère.  
TCR: "T cell receptor".  
TGF: "Tumor growth factor".  
TH9402: 4, 5-dibromorhodamine methyl ester.  
TNF: "Tumor necrosis factor".  
TNF-R1: Récepteur du TNF.  
TRAIL: "TNF-related apoptosis inducing ligand receptor".  
Treg : Cellules T régulatrice.  
UVA : Rayons ultraviolets de type A ("ultra violet A radiation").  
ZnPc : Phtalocyanine de zinc.



*À toi papa, pour ton amour, ta présence et tes conseils judicieux.*

*À toi maman, pour tes sacrifices, ta détermination et ton affection.*

*À Yassar, Nidal et Darine pour votre présence dans les bons et les moins bons moments.*

*À ma belle famille pour leur encouragement*

*À toi Ahmad, mon amour pour ton soutien constant et ta confiance inébranlable en moi*

*À toi, ma chère Zeinab, pour la lumière de tes yeux, et la chaleur de ton sourire.*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens d'abord à remercier sincèrement Dr Denis-Claude Roy de m'avoir permis de m'intégrer au sein de son équipe de recherche. Je suis reconnaissante de sa confiance en moi et de son enthousiasme contagieux qui m'ont permis de parvenir à la fin de ce projet.*

*Je tiens à remercier également Dr Gorazd Krosl pour sa disponibilité et ses nombreux conseils.*

*J'adresse mes chaleureux remerciements à Dr Yves Paquette pour ses nombreux conseils et ses qualités pédagogiques exceptionnelles.*

*J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire pour leur support technique et leur disponibilité, et plus particulièrement Brigitte Moreau, pour sa collaboration étroite.*

*J'aimerais souligner l'apport de la compagnie Celmed BioSciences.*

*Finalement, je remercie mon époux Ahmad, pour son support inconditionnel, et sa présence lors des moments creux de ma démarche académique.*

**Première partie**  
**INTRODUCTION**

## **Introduction**

### **1. La thérapie photodynamique (PDT)**

La thérapie photodynamique est une modalité thérapeutique encore largement expérimentale mais qui s'est révélée efficace pour le traitement de plusieurs maladies néoplasiques (lymphomes non-hodgkiniens, lymphomes T épidermotropes (CTCL : "cutaneous T cell lymphoma"), cancers de la peau, certaines tumeurs solides cervicales, pulmonaires et oesophagiennes). Cette stratégie est aussi utilisée pour le traitement de conditions non néoplasiques, incluant des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque, la prévention du rejet de greffe dans le cadre de transplantations d'organes solides, ainsi que pour la prévention et le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte, dans le cadre de greffes de cellules souches hématopoïétiques.<sup>1-4</sup>

#### **1.1. Définition**

La PDT dépend de l'action conjuguée d'une substance photosensible, de la lumière émise par un laser, une diode ou une lampe à filtre (lumière blanche) et de l'oxygène intracellulaire. La thérapie photodynamique est basée sur la rétention préférentielle du photosensibilisateur par les cellules ciblées, à savoir les cellules cancéreuses ou immunologiquement actives, dans le contexte de maladies auto-immunes ou allo-immunes. Lorsque ces molécules sont activées par une lumière de longueur d'onde appropriée (selon le pic d'absorption du photosensibilisateur), des formes actives de l'oxygène, comme les radicaux libres et les singlets d'oxygènes ( $^1\text{O}_2$ ), sont générées. Leur accumulation dans les membranes cellulaires, le cytoplasme et les organelles de la cellule provoquent des réactions de peroxydation qui peuvent endommager les cellules cibles et mener à leur destruction. Ainsi l'agent photosensibilisateur pénètre d'abord dans les cellules cibles et est retenu de façon préférentielle dans ces dernières. Par la suite, une exposition à une lumière de longueur d'onde compatible avec le spectre d'absorption du photosensibilisateur conduit à son activation. Comme le niveau d'activation énergétique est instable, l'énergie accumulée par le colorant (agent photosensibilisateur) est relâchée et conduit à la formation de radicaux libres, ce qui explique l'élimination des cellules du tissu-cible.<sup>5</sup>

## 1.2. Mécanisme d'action de la PDT

Lorsque l'agent photosensible retenu dans les tissus cibles absorbe un photon, un électron passe à un niveau orbital plus élevé. L'agent photosensible, alors sous la forme de singlet, est dans un état d'excitation dont la durée de vie varie de 1 à 100 nanosecondes. Ces singlets peuvent retourner à leur état basal en émettant de la lumière ou de la chaleur, ou encore passer à un état d'excitation sous forme de triplet qui a une durée de vie de quelques microsecondes, ce qui lui permet de réagir avec les autres molécules.

Ces triplets pourraient participer à des réactions d'oxydo-réduction résultant en un transfert d'électron ou d'hydrogène à un substrat ou à une autre molécule voisine qui elle, amènera la production de radicaux libres. En effet, ces dernières molécules peuvent réagir avec l'oxygène pour produire différentes formes d'oxygène réactif (ROS : "reactive oxygen species"). C'est la réaction photo-chimique de type I.

Il est aussi possible que l'agent photosensibilisateur à son état d'excitation en triplet puisse transférer son énergie à l'oxygène moléculaire (réaction photo-chimique de type II) générant ainsi des molécules fortement réactives (singlets d'oxygènes) avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques causant ainsi l'oxydation des composantes cellulaires, des dommages et des réponses en aval menant à la mort des cellules accumulant préférentiellement les molécules photosensibles.<sup>6-8</sup>

La PDT agit en impliquant au moins trois principaux mécanismes: l'élimination cellulaire directe, et ceci par des dommages oxydatifs aux cellules tumorales et hyper-réactives; l'élimination cellulaire indirecte due au dommage photodynamique ou à l'arrêt de la (néo)vascularisation et induisant une perte d'accès de la tumeur à l'oxygène et aux nutriments nécessaire à sa croissance; à ces deux mécanismes s'ajoute une contribution anti-tumorale additionnelle des réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte (effet immuno-modulateur de la thérapie photodynamique).

### 1.3. Facteurs influençant la réponse des cellules à la PDT

La réponse des cellules à ce type de thérapie dépend de l'agent photosensibilisateur utilisé ainsi que de sa localisation. Ainsi, deux agents photosensibilisateurs, même s'ils appartiennent à la même famille de molécules et comportent des structures basiques et des caractéristiques biochimiques similaires, peuvent avoir des actions différentes. De la même façon, ils peuvent cibler les mêmes organites tout en présentant des actions différentes suite à leur exposition à la lumière. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que de petites différences dans les caractéristiques physico-chimiques des différents composés peuvent altérer leur affinité pour certains sites de liaison, qu'elles soient spécifiques ou non spécifiques. Ceci altère donc leur rétention et leur distribution cellulaire.<sup>9</sup>

La localisation cellulaire de l'agent photosensible a une importance particulière puisqu'elle détermine le lieu de dommage primaire induit par cette thérapie. Dans les réactions de transfert d'électrons ainsi que de transfert d'énergie dans lesquelles des radicaux oxygène sont générés, une proximité entre l'agent photosensible et la cible est indispensable. En effet, l'oxygène ne peut diffuser que sur une distance d'environ 20 nm durant sa vie. L'hydrophobicité et la charge des agents photosensibles semblent déterminer leur mode de localisation cellulaire (lysosome, mitochondrie et cytoplasme).<sup>10,11</sup>

Les conditions du traitement photodynamique (concentration, durée d'incubation de l'agent photosensible et conditions d'illumination) ainsi que le type cellulaire impliqué, influencent fortement la réponse des cellules à la PDT.<sup>12-16</sup>

L'état d'oxygénation du tissu est particulièrement important puisque les structures cellulaires ayant une forte concentration en oxygène et en agent photosensible seront préférentiellement endommagées après illumination.

## **1.4. Profil de distribution cellulaire des agents photosensibles**

### **1.4.1. Ciblage des mitochondries**

La majorité des agents photosensibles qui se sont révélés efficaces pour le traitement de maladies néoplasiques et non néoplasiques ciblent les mitochondries.

Les mitochondries fonctionnelles sont polarisées tout le long de leur membrane, avec une membrane interne chargée négativement par rapport à la membrane externe. La polarisation mitochondriale a une grande influence sur la distribution des agents photosensibilisateurs puisque ces derniers peuvent être eux-mêmes chargés positivement ou négativement. Ainsi, une étude de Woodburn et al a montré que la charge de l'agent photosensible influence sa localisation. Un agent photosensibilisateur présentant une forme cationique (porphyrine) montre une tendance à se localiser au niveau mitochondrial (chargé négativement), alors qu'un photosensibilisateur avec une forme anionique se localisera plutôt au niveau lysosomal.<sup>17</sup>

La distribution des agents photosensibles dans les mitochondries peut aussi être due à d'autres facteurs comme des interactions spécifiques avec certaines protéines ou certains lipides particuliers tels que la cardiolipine et la phosphatidyl sérine qui sont présentes en quantité élevée dans la membrane mitochondriale interne. Enfin, des interactions non spécifiques comme celles associées à leur propriété d'hydrophobicité (molécules anioniques) vont promouvoir un ciblage préférentiel au niveau mitochondrial. L'accumulation des molécules cationiques dépend donc non seulement de la charge mais aussi du degré de lipophilicité de la molécule. Ainsi, parmi une série de molécules cationiques de phtalocyanine de zinc, les molécules les plus lipophiles s'accumulent dans les mitochondries de façon plus efficace que les molécules les moins lipophiles.<sup>10</sup>

La majorité des agents photosensibles cationiques sont utilisés dans le traitement des cancers puisqu'ils se localisent préférentiellement dans les cellules tumorales comparativement aux cellules normales. Ceci est attribué, du moins en partie, au nombre élevé de mitochondries qui sont retrouvées dans les cellules tumorales.

### **1.4.2 Ciblage des membranes**

Les membranes cytoplasmiques représentent des sites de localisation préférentielle des molécules photosensibles hydrophobes. Ces dernières, lorsque retenues dans les membranes cytoplasmiques, induisent l'activation des phospholipases A2 et C menant à la mort des cellules traitées par la PDT. Une étude d'Agarwal M.L. et al a montré que les cellules de lymphome L5178Y traitées avec la phtalocyanine d'aluminium meurent par apoptose et ceci après activation des phospholipases.<sup>18</sup>

### **1.4.3. Ciblage des lysosomes**

Ce sont les molécules photosensibles hydrophiles qui se localisent préférentiellement dans les lysosomes.<sup>19</sup> Ces molécules pourraient causer la mort des cellules par deux différents mécanismes: soit par le relâchement des enzymes lysosomales dans le cytosol; soit par la relocalisation des molécules photosensibles après illumination dans d'autres organites cellulaires.

### **1.4.4. Redistribution des agents photosensibles**

Un problème critique dans l'étude de la localisation cellulaire provient de la redistribution de l'agent photosensible qui peut survenir suite au dommage induit par le traitement photodynamique lui-même. La redistribution semble plus évidente avec les agents ciblant les lysosomes puisque ces derniers sont rapidement détruits suite au traitement et relâchent leur contenu dans d'autres organites tels que les mitochondries. De même cette redistribution est observée avec les agents ciblant les mitochondries, qui relâchent leur contenu dans le cytoplasme suite à l'irradiation.<sup>20</sup>

Quelques porphyrines cationiques ont montré une relocalisation des membranes cytoplasmiques au cytosol durant l'irradiation. Ce phénomène est induit par un mécanisme encore non élucidé et amène une inactivation spécifique des procaspases-9 et procaspases-3 ainsi que l'inhibition du processus apoptotique en faveur d'une mort cellulaire par nécrose.<sup>21</sup>



## 1.5. Voies de signalisations induites par la PDT

La majorité des agents photosensibilisateurs utilisés dans les essais pré-cliniques et cliniques se localisent et exercent leur action dans les mitochondries, ce qui mène à l'apoptose des cellules cibles. Cependant, il est aussi fréquent d'observer l'induction de la mort cellulaire par des mécanismes de nécrose cellulaire.<sup>22</sup>

### 1.5.1. Définition apoptose *versus* nécrose

Depuis que le terme " apoptose " à été introduit en 1972, la mort des cellules est habituellement attribuée à deux mécanismes, soit l'apoptose ou la nécrose.<sup>23</sup> L'apoptose est un processus physiologique normal essentiel pour le contrôle, le développement et l'homéostasie des tissus. Il s'agit d'un phénomène de suicide programmé, induit et ordonné dans lequel la cellule participe à sa propre disparition. Ce suicide est sous le contrôle de signaux intracellulaires et extracellulaires menant à des changements morphologiques. Ces changements produisent une diminution prononcée du volume cellulaire, une modification du cytosquelette, une turgescence de la membrane cytoplasmique, une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN en petits fragments. Suite à ces changements, la cellule élimine des corps apoptotiques qui sont entourés par des membranes contenant des organites intacts. Les macrophages ainsi que les cellules des tissus environnants éliminent les corps apoptotiques et les cellules parvenues à des stades avancés d'apoptose.

L'importance de ce mécanisme réside dans le fait qu'il prévient la libération du contenu cellulaire, y compris les enzymes protéolytiques, les autres enzymes lytiques, les protéines cationiques et les molécules oxydantes dans les tissus environnants. Ainsi l'apoptose n'induit pas de réaction inflammatoire locale.

Par contre, la nécrose diffère considérablement de l'apoptose. Elle représente une mort cellulaire suite à une lésion tissulaire, un dommage extrême. Suite au phénomène de nécrose, les cellules perdent leur intégrité membranaire ce qui cause une libération de leur contenu dans les tissus environnants. Ceci déclenche éventuellement une réponse inflammatoire dommageable.

### 1.5.2. La voie apoptotique

L'activation de la famille des cystéines protéases (caspases) synthétisées sous forme de zymogènes (procaspases) ayant une activité intrinsèque mineure, est impliquée dans les changements morphologiques menant à la mort des cellules par apoptose. Deux voies séparées menant à l'activation des procaspases sont clairement identifiées :

La voie extrinsèque est initiée par la liaison des ligands de mort ("death ligand") : Fas-L (ligand de Fas), TNF- $\alpha$  ("tumor necrosis factor-  $\alpha$ "), et TRAIL ("TNF-related apoptosis inducing ligand receptor") à leur récepteur de surface spécifique soit Fas, TNF-R1, et le récepteur de TRAIL, respectivement. Ceci induit la formation du DISC ("death induced signaling complex"), suite auquel les procaspases-8 et 10 sont recrutées et activées. Ces dernières vont à leur tour cliver les caspases effectrices 3 et 7.<sup>24</sup>

L'activation de la voie intrinsèque est initiée par un stress extracellulaire, comme celui de la thérapie photodynamique, ou intracellulaire. Ceci provoque la perméabilisation des membranes mitochondriales externes et le relâchement des molécules apoptogéniques, entre autre le cytochrome *c*, dans le cytosol grâce à la formation des pores mitochondriaux dont la nature moléculaire n'est pas encore élucidée. Le cytochrome *c* se lie à Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor-1") qui à son tour, en présence d'ATP, active la procaspase-9, et les autres caspases effectrices, incluant la caspase 3, menant à l'apoptose. Le relâchement du cytochrome *c* est régulé par les différents membres de la famille de Bcl-2.

Une interaction entre ces deux voies apoptotiques est assurée par la caspase 8 activée (voie extrinsèque) qui clive Bid (protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2). Bid induit l'oligomérisation de Bax et son insertion dans la membrane mitochondriale externe, et mène au passage du cytochrome *c* dans le cytosol. Bax pourrait être un bon candidat pour tenter de déterminer la nature des pores mitochondriaux.<sup>25</sup>

### 1.5.3 Régulation de l'apoptose par la PDT

Jusqu'à maintenant, la majorité des études réalisées dans le but d'élucider le programme apoptotique, ainsi que les voies spécifiques de signalisation initiées par la PDT, rapportent que les agents photosensibilisateurs qui se localisent dans les mitochondries

provoquent un relâchement immédiat du cytochrome *c* dans le cytosol suivi par l'activation de l'apoptosome et de la procaspase-3. Cette dernière joue un rôle central dans la phase d'exécution de l'apoptose.<sup>26-28</sup>

Cependant, certaines études montrent qu'il existe des mécanismes caspases-indépendants. En effet, la suppression complète de la caspase-3 des cellules leucémiques HL60 par un inhibiteur chimique ne prévient pas la mort cellulaire suite au traitement par l'acide 5-aminolévulinique (ALA), mais la caspase-3 est nécessaire pour que s'exercent les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose.<sup>29</sup> Aussi, le récepteur Fas contribue au dommage cellulaire induit par la PDT.<sup>30</sup>

D'autres études suggèrent une implication de Bcl-2 et de Bax dans l'apoptose. En effet, la réponse des cellules à la PDT est influencée par le rapport Bax/Bcl-2. Une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 est associée à une augmentation de l'apoptose suite à la PDT. Cette même étude montre également une augmentation de l'expression de plusieurs autres protéines pro-apoptotiques (Bid, Bcl<sub>x<sub>s</sub></sub>, Bad) de façon à ce que le rapport des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques favorise l'apoptose.<sup>31</sup>

#### **1.5.4 Induction de la nécrose par la PDT**

La PDT pourrait induire une mort cellulaire par nécrose et ceci dépend essentiellement de la localisation de l'agent photosensible dans les cellules traitées. Les agents photosensibilisateurs qui se localisent principalement dans les membranes cytoplasmiques favorisent plutôt une mort cellulaire par nécrose. Ainsi, une étude de Hsieh et al démontre que l'incubation des cellules A431 pendant 3 heures avec le photofrin amène une localisation dans les membranes cytoplasmiques et provoque l'élimination des cellules par nécrose.<sup>32</sup> Ceci est dû à une déplétion rapide de l'ATP, et à la production immédiate de différentes formes d'oxygène réactif (ROS) qui s'accumulent dans les membranes plasmiques et provoquent la destruction des cellules cibles. Malgré l'activation de voies de signalisation similaires à celles observées dans l'apoptose (activation retardée de la caspase-3, perte du potentiel membranaire mitochondrial), le dommage des membranes cytoplasmiques semble plutôt moduler la balance en faveur d'une mort cellulaire par nécrose. Ceci a été également démontré dans une étude utilisant le phtalocyanine de zinc (ZnPc).<sup>33</sup>

### 1.5.5 La PDT induit-elle l'apoptose ou la nécrose des cellules cibles?

La PDT pourrait induire soit l'apoptose, soit la nécrose, soit une combinaison des deux mécanismes. Cette propriété de la PDT pourrait avoir une grande importance thérapeutique puisqu'il est possible de concevoir une modulation du traitement de PDT qui permettrait de favoriser l'un ou l'autre mécanisme de mort cellulaire, ou encore les deux, selon l'effet désiré.

Le mécanisme de la mort induite par la PDT dépend de plusieurs facteurs : du type de cellules à traiter, des conditions du traitement (concentration de l'agent photosensible, temps d'incubation, dose de l'irradiation), des caractéristiques physicochimiques (lipophilicité et charge) de l'agent photosensible, et de sa localisation intracellulaire. Ce dernier facteur détermine le site du dommage photodynamique primaire à cause de la diffusion limitée des singlets d'oxygène. En général, les molécules photosensibles se localisant préférentiellement dans les mitochondries (dérivés de la porphyrine) et les membranes des autres organelles activent la voie apoptotique. Celles qui se localisent dans les membranes cytoplasmiques semblent plutôt moduler la balance en faveur d'une mort cellulaire par nécrose. Ceci semble dû à une perte de l'intégrité membranaire et une déplétion rapide de l'ATP intracellulaire.<sup>32,33</sup>

Quelques porphyrines cationiques ont démontré durant l'irradiation une relocalisation des membranes cytoplasmiques vers le cytosol induisant ainsi l'inhibition du processus apoptotique en faveur d'une mort cellulaire par nécrose.<sup>34</sup>

Puisqu'une perte de régulation de l'apoptose pourrait mener à des maladies graves et puisque plusieurs cellules cancéreuses perdent leur capacité à entrer en apoptose suite à des signaux de danger ou à des dommages tissulaires par des intervention thérapeutiques, la thérapie photodynamique a pris une importance particulière dans le traitement des cancers.<sup>35,36</sup>

## 2. Grefe de moelle osseuse et système immunitaire.

### 2.1. Introduction

La greffe de moelle osseuse (GMO) est un traitement de choix pour les patients dont le système hématopoïétique est défectueux et doit être remplacé. Les applications majeures de cette thérapie ont pour but :

- 1- D'apporter un système immunitaire fonctionnel en cas d'immuno-déficience génétique, telle que l'immunodéficience combinée sévère (SCID, de "*severe combined immunodeficiency*") : greffe allogénique.
- 2- Remplacer un système hématopoïétique défectueux par un système fonctionnel pour le traitement des maladies hématopoïétiques non malignes telles que la thalassémie (désordre génétique) et l'anémie aplasique (désordre acquis souvent avec dysrégulation immunologique) : greffe allogénique.
- 3- Restaurer le système hématopoïétique du patient dans le cas des patients atteints de cancers, tel que la leucémie lymphoïde aigue, et la leucémie myéloïde aigue et chronique : greffe allogénique ou autologue.

Dans le cas de greffe de moelle osseuse allogénique ou autologue, le remplacement des cellules de la moelle osseuse du receveur par des cellules souches hématopoïétiques saines nécessite le conditionnement de l'hôte (receveur). Ceci a pour but de détruire les cellules défectueuses de la moelle osseuse. Le conditionnement implique des doses élevées de chimiothérapie et souvent de radiothérapie qui éliminent non seulement les cellules souches hématopoïétiques (CSH) endogènes, mais les progéniteurs et une partie des lymphocytes matures. Dans les cas de patients atteints de cancer, cette étape de conditionnement permet une cytoréduction des cellules tumorales.

Dans le cas de greffe de moelle osseuse allogénique, le greffon est responsable de la reconstitution immune post-greffe, et donc de la génération *de novo* des cellules myéloïdes et lymphoïdes. Le devenir du greffon dépend donc essentiellement des réactions immunologiques des cellules immunocompétentes du donneur envers les antigènes du receveur tels les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou les antigènes leucocytaires humains (HLA) et les antigènes mineurs d'histocompatibilité (Ag miHA). Ces réactions sont évitées dans le cas des autogreffes.

## 2.2. Type de Greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH)

### 2.2.1. GCSH autologue.

Une greffe de cellules souches est désignée autologue lorsque les cellules du greffon proviennent de la personne à traiter (le receveur est aussi le donneur). Les cellules souches du patient sont mobilisées suite à l'administration de facteurs de croissance hématopoïétiques. Ceci amène une sortie des cellules souches de la moelle osseuse qui accèdent à la circulation sanguine. Ce sont ces cellules souches circulantes qui sont prélevées grâce à un appareil d'aphérèse. Cet appareil permet de sélectionner les cellules souches selon leurs caractéristiques physiques lors de la centrifugation. Ces cellules sont congelées pour être ensuite administrées au patient après qu'il ait reçu un traitement myéloablatif pour éliminer ses cellules cancéreuses. Il est possible de soumettre les cellules du greffon prélevé à une procédure de purge *ex vivo* qui a pour but d'éliminer les cellules cancéreuses du patient qui contaminent le greffon, tout en préservant les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs normaux. La GCSH autologue est un traitement intéressant qui a été utilisé dans plusieurs hémopathies malignes comme la leucémie myéloïde aigue et chronique, la leucémie lymphoblastique aigue et chronique, le myélome multiple, le lymphome hodgkinien et non-hodgkinien, et certains désordres du système immunitaire tels que des maladies auto-immunes à des stades avancés de leur évolution (arthrite rhumatoïde sévère et lupus érythémateux disséminé).

Le fait d'éviter le problème de l'histo-incompatibilité entre le donneur et le receveur constitue l'avantage majeur de cette procédure. L'autogreffe élimine tout risque de maladie du greffon contre l'hôte (GVH) ou rejet de greffe. Cependant la contamination du greffon par les cellules tumorales est un facteur non négligeable pouvant mener à la rechute de la maladie néoplasique. Présentement plusieurs études visent à optimiser la procédure de traitement du greffon pour éliminer un maximum de cellules tumorales et un minimum de progéniteurs hématopoïétiques normaux.

### 2.2.2. GCSH syngénique

Une GCSH est dite syngénique lorsque le donneur et le receveur sont des jumeaux identiques. Dans ce cas, il n'existe pas de barrière immunologique entre le donneur et le receveur. C'est une approche où l'on élimine les cellules malignes du receveur en utilisant des doses élevées de chimiothérapie et de radiothérapie. Les cellules non-néoplasiques de la moelle osseuse du patient, qui sont détruites par la chimiothérapie et la radiothérapie de préparation, sont remplacées suite à l'administration des CSH du donneur.

### 2.2.3. GCSH allogénique.

On parle d'allogreffe lorsque le donneur de cellules souches et le receveur sont deux individus qui appartiennent à la même espèce. Le problème majeur de cette approche réside dans la difficulté d'identifier des donneurs compatibles avec le receveur au niveau des antigènes de transplantation, soit les antigènes du groupe HLA ("Human Leucocyte Antigen"). Le donneur peut être apparenté (frère ou sœur) ou non apparenté (banque internationale de donneurs) mais il doit malgré tout être compatible avec le receveur au niveau des principaux antigènes du groupe HLA. La nécessité d'utiliser un donneur compatible au plan du HLA restreint de façon importante le nombre de donneurs potentiels. Ce type de greffe est celui qui a le plus vaste profil d'application, puisqu'elle permet de donner des cellules souches hématopoïétiques normales. Ce type de greffe peut donc être utilisé chez les patients avec une maladie intrinsèque de la moelle osseuse, comme l'aplasie médullaire ou les syndromes myélodysplasiques. Comme l'autogreffe, l'allogreffe permet principalement de traiter des maladies néoplasiques telles que les leucémies myéloïdes et lymphoïdes, mais l'accès à des cellules souches normales facilite grandement son application et permet de traiter des individus avec une maladie qui permet difficilement une collecte de cellules souches saines, comme c'est le cas pour les patients qui sont en pleine rechute leucémique.

### 2.3. Sources de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Il existe trois sources de cellules souches hématopoïétiques :

➤ Le greffon médullaire :

Les cellules souches hématopoïétiques dans ce cas proviennent de la moelle osseuse, le site principal de l'hématopoïèse. Jusqu'à récemment, la transplantation de moelle osseuse a été le moyen habituel de restauration du système hématopoïétique. Cependant l'élément essentiel de la transplantation de moelle osseuse est la transplantation de cellules souches, et un nombre suffisant de cellules souches peut être obtenu à partir d'autres tissus tels que le sang de donneurs enfants ou adultes (suite à une mobilisation) ou le sang de cordon ombilical.

➤ Le greffon de sang mobilisé.

Le sang a remplacé la moelle osseuse comme source majeure de cellules souches hématopoïétiques dans la majorité des indications de greffe. Afin d'obtenir des préparations enrichies en cellules souches hématopoïétiques (CSH), on administre des facteurs de croissance qui favorisent la mobilisation de ces cellules et leur passage de la moelle vers le sang. Cette source alternative de cellules souches est de plus en plus utilisée pour son accessibilité, la rapidité de prise hématologique des cellules ainsi stimulées (environ 1 semaine de moins que pour les greffons de moelle osseuse pour atteindre une récupération neutrophilique basale), ainsi que le peu d'effets secondaires : le donneur n'a pas à subir d'anesthésie générale, ou de procédures invasives (introduction d'aiguilles dans le bassin pour recueillir la moelle osseuse).<sup>37</sup>

➤ Greffon de sang placentaire

Le sang retrouvé au niveau du cordon ombilical contient un grand nombre de cellules souches circulantes. De plus, les cellules du sang de cordon ombilical sont des cellules relativement immatures sur le plan immunitaire. Leur prélèvement à la naissance et leur congélation permet la réalisation de greffes de CSH qui sont HLA incompatibles. Les greffes effectuées à partir du sang de cordon échouent plus souvent que celles effectuées par le sang mobilisé. En effet, bien que les CSH obtenues de cordons ombilicaux provoquent moins de



maladie du greffon dirigée contre l'hôte, elles sont souvent associées à un retard ou un défaut de reconstitution hématologique et immunologique. Lors de cette procédure, la quantité de cellules administrées est très importante et dépend du poids du receveur (idéalement plus de  $3 \times 10^7$  cellules nucléées/Kg). Ceci explique que cette source de cellules est principalement utilisée pour la greffe de CSH chez les enfants.

#### **2.4. Complications dues à la greffe de moelle osseuse**

Dans tout procédé de transplantation, que ce soit dans la greffe autologue ou allogénique, le régime de conditionnement de l'hôte qui résulte en une forte dose de chimiothérapie et de radiothérapie a des effets néfastes sur l'organisme. Il cause des lésions au niveau des muqueuses gastro-intestinales, des tissus lymphoïdes et de l'épithélium thymique. Ces lésions augmentent en fonction de la dose d'irradiation ou de chimiothérapie.<sup>38</sup>

Dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique, les différences antigéniques entre le donneur et le receveur peuvent conduire à des réactions de rejet bidirectionnel. Ce rejet dépend habituellement d'un mécanisme actif d'origine immunitaire. En plus du rejet par l'hôte du tissu transplanté (hôte contre greffon ou HVG), les lymphocytes T du greffon (donneur) peuvent attaquer et réagir contre les antigènes d'histocompatibilité de l'hôte causant ainsi la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD : "graft versus host disease"). Les dommages causés par cette maladie apparaissent au niveau de trois principaux organes soit le foie, la peau et le tube digestif.

Les médicaments immunosuppresseurs peuvent prévenir les réactions de rejet, mais leur utilisation peut être associée à de graves effets secondaires. Ces agents, de même que la GVHD créent un état d'immunodéficience d'où l'augmentation du risque d'infections à cytomégalovirus (CMV) et au virus d'Epstein Barr (EBV).<sup>39,40</sup>

### 3. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

Dans tous les procédés de transplantations allogéniques, les différences antigéniques au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité peuvent mener à des réactions de rejet. En plus du rejet par l'hôte, les lymphocytes du donneur attaquent les tissus du receveur provoquant ainsi la maladie du greffon contre l'hôte.

En 1956, Barnes *et al* décrivent une maladie mortelle suite à l'infusion de splénocytes normaux dans des souris irradiées. Malgré la reconstitution immune ces souris éprouvent une maladie secondaire caractérisée par une diarrhée, une cachexie, un érythème, une splénomégalie et une diminution importante du poids. Ces symptômes sont souvent mortels.<sup>41</sup> C'est la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).

La GVHD est une complication majeure qui survient après la greffe de moelle osseuse. Elle est la conséquence de la réaction des lymphocytes T du greffon contre les alloantigènes du receveur. L'activation et la prolifération de ces cellules génèrent des réactions inflammatoires au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal et du foie. Ces complications s'aggravent avec la disparité du système HLA entre le donneur et le receveur.

Les méthodes conventionnelles pour prévenir la maladie de GVH telles que la déplétion des cellules T du greffon, et l'administration d'immunosuppresseurs comme le méthotrexate et la cyclosporine (blocage de la transduction du signal dépendant du calcium suite à l'engagement du TCR) sont souvent associées à des effets secondaires tels que l'immunodéficience, laquelle favorise des infections graves et des rechutes leucémiques, et un retard dans la prise du greffon. La maladie de GVH est classée en deux types : la maladie aiguë et la maladie chronique.

### 3.1. La GVHD aigue

La GVHD aigue survient dans les premiers jours jusqu'à plusieurs mois après la greffe de CSH. Les signes cliniques apparaissent principalement au niveau de la peau, du foie et du tractus gastro-intestinal.

Malgré l'administration d'immunosuppresseurs comme traitement prophylactique, le risque de cette maladie reste élevé. L'incidence de cette maladie est de 25 à 50 % dans le cas de greffes allogéniques avec des donneurs HLA-identiques apparentés, et de 50 à 80% dans le cas de greffes avec un donneur non apparenté.<sup>42,43</sup> Une portion importante des patients qui présentent une GVHD aigue vont développer une GVHD chronique. L'érythrodermie généralisée de la peau, les hémorragies digestives et l'insuffisance hépatique menacent le pronostic vital. De 15 à 40 % des patients allogreffés avec des cellules provenant d'un frère ou d'une sœur HLA-compatible meurent suite à cette maladie. Le taux de mortalité atteint 40 à 80 % dans le cas des allogreffes réalisées à partir d'un donneur non apparenté.<sup>42</sup>

### 3.2. La GVHD chronique

La GVHD chronique survient plus tard que la GVHD aigue, soit par définition plus de 100 jours post-greffe. La GVHD chronique peut être différenciée de la GVHD aigue par le fait que ses signes cliniques ressemblent à ceux des maladies auto-immunes.<sup>44</sup> La sclérodermie, la fibrose cutanée en plaque, l'ulcération muco-cutanée, la cholestase sont en partie dues à l'apparition d'anticorps (Ac) contre des protéines intracellulaires et des antigènes nucléaires. (Ac anti-ADN simple brin et Anti-ADN double brin).

Les thérapies conventionnelles tel que les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs démontrent un effet partiel sur l'évolution de cette maladie. L'incidence de la GVHD chronique est de 30 à 50% après une greffe myélo-ablative de cellules souches HLA identiques. L'allogreffe de cellules souches provenant du sang périphérique augmente encore l'incidence de cette maladie.<sup>45</sup>

### 3.3. Conditions de la maladie

Billingham *et al* en 1957 détermine les trois pré requis pour le développement de la GVHD.<sup>46</sup>

- Le receveur doit être immunodéprimé ; un patient ayant un système immunitaire normal rejette les cellules T provenant d'un autre donneur, ce qui prévient la GVHD.
- Le greffon doit contenir des cellules immunologiquement compétentes. Les cellules T matures sont les cellules médiant la GVHD.
- Le receveur doit exprimer des Ag tissulaires qui ne sont pas présents chez le donneur. Les différences au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité représentent le principal facteur de risque pour la maladie de GVH. Les différences au niveau du complexe mineur d'histocompatibilité sont aussi impliquées dans la physiopathologie de la GVHD.

### 3.4. Physiopathologie de la GVHD aigue

Les études de modèles animaux ont permis une meilleure compréhension de la cascade des événements cellulaires et humoraux médiant la maladie de GVH. L'immunophysiopathologie de la maladie de GVH est à nos jours grandement élucidée et considérée comme un processus à deux phases.

#### 3.4.1. La phase afférente de la GVHD

Cette phase est divisée en plusieurs étapes ; la première étape commence avant la greffe. Le régime de conditionnement de l'hôte (chimiothérapie et radiothérapie), et les infections antérieures provoquent des dommages au niveau des tissus endothéliaux et épithéliaux de l'hôte. Les cellules activées secrètent alors du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1. La présence de ces cytokines induit une surexpression des molécules d'adhésion<sup>47</sup> et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).<sup>48</sup>

Les cellules T greffées rencontrent non seulement un environnement étranger mais aussi altéré par des cytokines, des molécules d'adhésion et des molécules du CMH, ce qui

augmente la reconnaissance des antigènes du CMH de l'hôte par les cellules T matures contenues dans le greffon.

La deuxième étape de la phase afférente de la maladie de GVH est caractérisée par l'activation des cellules T qui nécessite deux signaux : le premier signal est assuré via l'interaction TCR-peptide-CMH à la surface d'une cellule présentatrice d'antigènes de l'hôte ou du donneur ; et le second est un signal de co-stimulation via B7/CD28, CD4, CD8, LFA1, LFA2, et CD44.<sup>49,50</sup>

Les différences au niveau des molécules du CMH de classe II (HLA-DP, DQ, DR) activent les cellules CD4, tandis que les différences au niveau des molécules du CMH de classe I activent les cellules CD8. Cette phase afférente de la maladie peut être induite par les cellules CD4, les CD8 ou les deux populations simultanément.

La présentation d'antigènes aux cellules T induit des changements biochimiques intracellulaires comme l'augmentation du calcium cytoplasmique et l'activation de protéine kinases et tyrosine kinases aboutissant à la transcription des gènes de l'IL-2,<sup>51</sup> de l'IFN- $\lambda$ , et de leur récepteur qui sont les médiateurs critiques de la GVHD aigüe. Le blocage de l'IL-2 par des anticorps monoclonaux pourrait inhiber la maladie de GVH dans les modèles expérimentaux animaux.<sup>52</sup> L'IL-2 joue un rôle central dans l'activation, et l'induction des cellules T cytotoxiques (CTL) ainsi que des cellules NK. L'IFN- $\lambda$  active les macrophages de l'hôte et du donneur durant la phase de GVH pour produire des cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1.<sup>53</sup>

### **3.4.2. La phase efférente de la maladie de GVH**

La phase efférente de la maladie de GVH est une phase complexe. Les lymphocytes T cytotoxiques causent la majorité des dommages tissulaires mais ne sont pas les seuls, puisque plusieurs cellules participent dans cette phase.

Les cellules NK sont des effecteurs importants de la GVH et contribuent aux atteintes tissulaires observées. Les phagocytes mononuclées reçoivent deux signaux d'activation pour sécréter des cytokines inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, amplifiant ainsi la cascade d'événement. Le premier signal est assuré par des cytokines de la phase afférente ; le deuxième signal par des lipopolysaccharides (LPS) libérés via la muqueuse

intestinale endommagée par le régime de conditionnement de l'hôte.<sup>53</sup> Les LPS pourraient atteindre la peau pour stimuler les kératinocytes et les fibroblastes dermiques à produire des cytokines.<sup>54</sup> Le TNF- $\alpha$  cause des dommages directs aux tissus en causant la nécrose des cellules cibles.<sup>55</sup> Le TNF- $\alpha$  pourrait également induire la mort des cellules par apoptose, ce qui représente une caractéristique de la maladie de GVH du gros intestin après la greffe de moelle osseuse. L'oxyde nitrique sécrété par les macrophages activés contribue à l'effet néfaste de la maladie de GVH.<sup>56</sup>

#### **4. Application clinique de la PDT extracorporelle ou photophérèse extracorporelle (ECP)**

##### **4.1. Traitement et prévention des différentes maladies**

###### **4.1.1. Maladies oncologiques**

La thérapie photodynamique extracorporelle ou photophérèse extracorporelle (ECP) est utilisée avec succès pour le traitement des lymphomes non-hodgkiniens T épidermotropes (CTCL : "cutaneous T cell lymphoma") de type Sézary (à cellules malignes circulantes). Il s'agit d'une pathologie de mauvais pronostic. Les thérapies conventionnelles induisent une rémission le plus souvent partielle et de courte durée, d'où l'importance de l'ECP qui a montré son efficacité dans le traitement de cette maladie. La photothérapie n'induit pas d'effets secondaires majeurs d'où la possibilité de l'associer à la thérapie immunosuppressive classique. Les premiers résultats qui se sont révélés très encourageants ont été publiés par Edelson et al en 1987.<sup>57</sup> Ce dernier a rapporté une amélioration de 83 % des patients traités par deux traitements consécutifs d'ECP par mois or, ces patients étaient résistants à la thérapie conventionnelle. Ceci a été confirmé plus tard par d'autres équipes.<sup>58,59</sup> La PDT s'est aussi révélée efficace dans le traitement de cancers de la peau<sup>60</sup> et de certaines tumeurs solides cervicales, pulmonaires, oesophagiennes et gastro-intestinales.<sup>61-63</sup>

###### **4.1.2. Les maladies auto-immunes**

Certaines études suggèrent que l'ECP pourrait aussi avoir une place dans le traitement de patients atteints de maladies auto-immunes. Son effet bénéfique a été démontré dans

le traitement de maladies auto-immunes de mauvais pronostic comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, et la sclérose en plaques.<sup>64-66</sup>

#### **4.1.3. Les greffes de moelle osseuse autologues**

Dans la greffe de cellules souches autologue où le receveur est aussi le donneur, le greffon prélevé peut contenir des cellules cancéreuses ou anormales. Il est logique de faire subir au greffon une procédure de purge afin d'éliminer les cellules leucémiques tout en préservant les progéniteurs hématopoïétiques.<sup>67</sup> La thérapie photodynamique a prouvé son efficacité à éliminer les cellules non désirées du greffon dans le cas de lymphome non-hodgkinien, de leucémie lymphoïde chronique et de leucémie myéloïde chronique.<sup>68-70</sup>

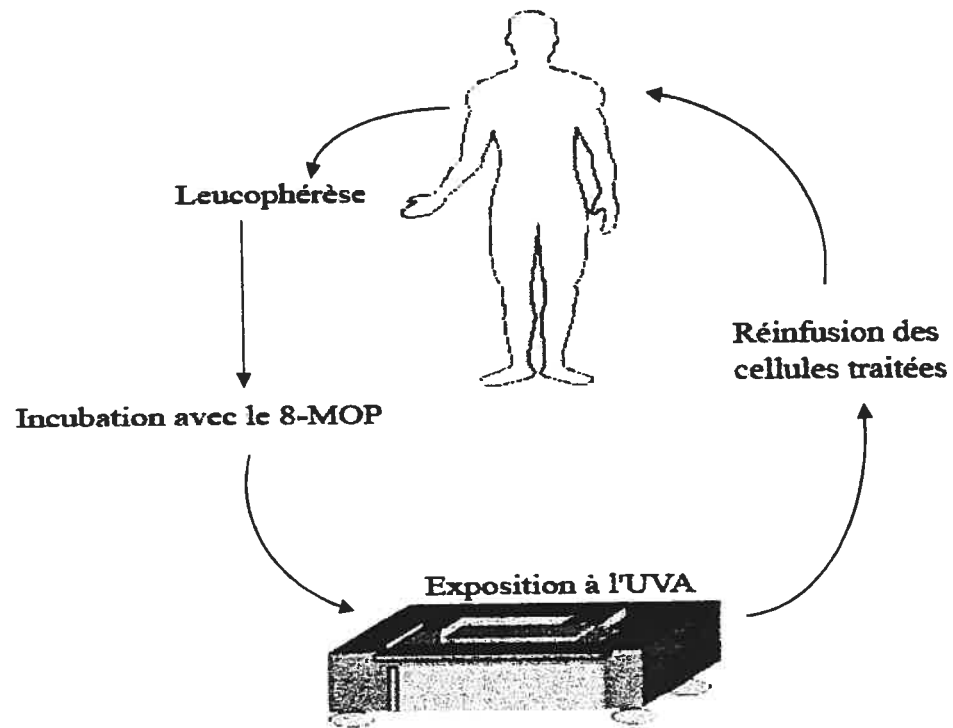
#### **4.1.4. La transplantation**

L'ECP est présentement utilisée dans la prévention des rejets de greffes d'organes solides (rein, cœur, etc.)<sup>71</sup>, et a fait ses preuves dans le traitement de la forme cutanée dans la maladies du greffon contre l'hôte (GVHD)<sup>72</sup> De plus, des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré que la PDT pouvait être utilisée pour prévenir la maladie de GVH après une greffe allogénique avec un donneur ayant une compatibilité HLA partielle.<sup>73</sup>

### **4.2. Aspects pratiques de la photophérèse extracorporelle**

L'utilisation clinique de la photophérèse implique un certain nombre d'étapes, que nous décrierons brièvement. Les leucocytes du sang du patient sont d'abord collectés par leucophérèse. La suspension cellulaire est transférée sous atmosphère contrôlée dans un sac permettant une transmission satisfaisante des rayons ultraviolets A (UVA), puis incubée avec un agent photosensibilisateur, l'agent le plus utilisé actuellement est le 8-methoxy-psoralen (MOP), puis exposée aux rayons UVA. Les cellules traitées sont ensuite réinfusées chez le patient. La qualité et la quantité des cellules collectées dépendent de la condition hématologique du patient. Cette procédure nécessite un double accès veineux, dure en moyenne 3 heures et demi. Le nombre ainsi que la fréquence des séances varient d'un patient à l'autre. Le plus souvent elles sont réalisées à raison de deux séances consécutives en 2 jours avec une périodicité hebdomadaire.

Lorsque l'état du patient s'améliore, les séances de traitement sont espacées, mais le traitement est poursuivi pendant plusieurs mois. Cette approche évite les inconvénients liés à l'ingestion du 8-MOP par le patient et présente peu d'effets secondaires majeurs.





### 4.3. Effet immuno-modulateur de la thérapie photodynamique

Les expérimentations animales où les lymphocytes T pathogènes sont traités par le 8-MOP et les rayons UVA suggèrent que l'ECP induit une réaction immunitaire contre les cellules T pathogènes. Il est intéressant de noter que cet effet est observé même si le traitement ne touche qu'un faible nombre des lymphocytes circulants.

Cette thérapie est efficace contre les maladies caractérisées par une auto-activation (maladies auto-immunes) ou une allo-activation (greffe d'organes et maladie du greffon contre l'hôte) du système immunitaire. Des études effectuées dans le cadre de maladies auto-immunes, de CTCL et de maladie du greffon contre l'hôte ont montré :

- Une délétion des cellules T autoréactives de l'hôte dans les maladies auto-immunes<sup>74</sup>, et des cellules alloréactives dans la maladie de GVH.<sup>75,76</sup> Une induction de l'apoptose des cellules T CD4+ dans les CTCL.<sup>77</sup>
- Une augmentation de l'expression de Fas-L par les cellules T favorisant leur apoptose. Cependant l'apoptose des monocytes est peu documentée.<sup>77</sup>
- Une maturation des monocytes en cellules dendritiques.<sup>78</sup>

Plusieurs auteurs suggèrent un effet immuno-modulateur de la PDT, qui résulte en une hypo-régulation de l'alloréactivité dans la maladie de GVH.<sup>75,76</sup>

## **5. Prévention et traitement de la GVHD.**

Les approches conventionnelles utilisées pour prévenir la maladie de GVH et la traiter ont pour but de bloquer la fonction des cellules T et ceci par l'utilisation d'immunosuppresseurs tels que le méthotrexate qui inhibe la prolifération cellulaire, en combinaison avec la cyclosporine. Ce dernier agent pharmacologique est administré pour bloquer la sécrétion de l'IL-2 par les cellules T. Cependant la déplétion des cellules T reste la prophylaxie de choix pour prévenir la maladie de GVH.

### **5.1. La déplétion des cellules T.**

La déplétion des cellules T du greffon capables de reconnaître et d'initier une réponse immunitaire contre les tissus de l'hôte prévient la maladie de GVH. La déplétion des cellules T fait habituellement appel à l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes tels que CD2, CD3, CD5, CD6 et CD7 ainsi que des anticorps de spécificité antigénique moins restreinte et reconnaissant les cellules T et B (CAMPATH-1M) tout en induisant la lyse par le complément.<sup>79-84</sup>

Ces méthodes de déplétion préservent des quantités variables de cellules T, selon la spécificité des anticorps monoclonaux utilisés. L'utilisation de ces diverses stratégies d'élimination des cellules T amène habituellement une disparition de la maladie de GVH, mais ce bénéfice clinique certain comporte aussi un prix non négligeable.

#### **5.1.1. Les désavantages de la déplétion des cellules T**

Les études faites dans les années 1980 confirment que la déplétion des cellules T diminue l'incidence de la maladie de GVH clinique de 10% à 20% et ceci après une greffe apparentée.<sup>85</sup> Cependant l'élimination des cellules T du greffon peut être associée à des effets secondaires souvent mortels.

Ainsi, la déplétion des cellules T est liée à une augmentation de l'incidence des infections à cytomégalovirus (CMV) et au virus Epstein-barr (EBV), ceci étant principalement dû au faible nombre de cellules lymphoïdes durant les premiers mois qui suivent la greffe. Après la reconstitution immune, le risque des infections diminue grâce

à la restauration du système hématopoïétique, mais ce phénomène est tardif.<sup>86</sup> Suite à la déplétion des cellules T, on note aussi d'autres complications importantes.

➤ Augmentation de l'incidence des rejets de greffe :

Les cellules lymphoïdes du receveur survivant au régime du conditionnement sont la cause du rejet de greffe. Les cellules T normalement présentes dans le greffon de cellules souches, ainsi que les cellules NK, reconnaissent et éliminent les cellules T résiduelles de l'hôte, ce qui prévient le rejet de greffe. Dans le cas de greffon T déplété, ces cellules sont majoritairement éliminées, ce qui laisse libre cours aux cellules T résiduelles de l'hôte pour exercer leur activité cytotoxique contre les cellules souches du donneur et engendrer une réaction de rejet. L'intensification du régime du conditionnement précédant la greffe de moelle osseuse pourrait réduire l'incidence des rejets. Néanmoins, un conditionnement trop sévère cause des dommages tissulaires associés à une relâche de cytokines, ce qui entraîne un effet néfaste sur l'incidence de la maladie de GVH.

➤ Augmentation des rechutes leucémiques

Les cellules T du greffon sont cruciales pour assurer une défense anti-leucémique de l'organisme. Leur déplétion est donc un obstacle majeur pour la GCSH allogénique, puisque le nombre de CD4 et CD8 générées de *novo* est faible durant les 3 mois qui suivent la greffe.<sup>87</sup>

➤ Reconstitution immune retardée

La déplétion des cellules T du greffon implique un changement majeur dans la reprise hématologique et immunologique post-greffe, ainsi que de la fonction des cellules T. En effet, la déplétion des cellules T du greffon provoque un déficit en cellules CD4+ ainsi qu'un ratio CD4+/CD8+ inversé pendant environ deux années suivant la greffe. Non seulement le nombre des cellules T est-il affecté après la reconstitution immunitaire mais ces cellules sont aussi altérées au niveau fonctionnel. Les cellules mononucléées du sang prolifèrent peu après stimulation par de l'IL-2 exogène pendant une période de 6 mois dans le cas d'une GCSH déplétée en cellules T comparativement à seulement 1 mois lors d'une greffe conventionnelle.<sup>88</sup> De plus, la déplétion des cellules T du greffon provoque la génération de cellules T avec une variabilité restreinte du répertoire TCR.<sup>89</sup>

## 5.2. Les cellules NK

Certaines études suggèrent un rôle des cellules NK dans la prévention de la maladie de GVH. En effet, le transfert de cellules NK ou NK-T activées du donneur semble permettre de supprimer la GVHD.<sup>90</sup> Les cellules NK secrètent de la TGF- $\beta$  qui a un effet suppresseur sur les lymphocytes T.

## 5.3. Les lymphocytes T régulateurs

Le rôle des lymphocytes T régulateurs dans la prévention et le traitement de la maladie de GVH a été récemment étudié dans des modèles expérimentaux. Lorsqu'elles sont administrées en grand nombre au moment de la greffe, ces cellules pourraient permettre de prévenir ou retarder l'incidence de la GVHD, d'où leur importance dans les applications cliniques de la GMO.

### 5.3.1. Caractéristiques des cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices représentent une sous-population des cellules T CD4<sup>+</sup> qui expriment constitutivement la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2. Les cellules T régulatrices forment 5 à 10% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à la fois chez l'homme et chez la souris. Elles se distinguent phénotypiquement des cellules T CD4<sup>+</sup> activées qui expriment CD25 par l'expression élevée de CD62L.<sup>91</sup> Les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> avec des propriétés régulatrices expriment le gène Foxp3 tandis que les cellules CD4<sup>+</sup> le perdent suite à leur activation.<sup>92</sup> Une caractéristique particulière des cellules est leur capacité à médier une suppression des cellules CD4 et CD8 conventionnelles.<sup>93</sup> Les cellules T régulatrices semblent jouer un rôle crucial dans le contrôle des maladies auto-immunes.<sup>94-96</sup> L'élimination des cellules T régulatrices, durant la photophérèse extracorporelle, pourrait donc induire une exacerbation des maladies auto-immunes. L'ECP doit être appliquée dans des conditions de traitement qui préservent cette importante population lymphocytaire que ce soit dans le traitement de la GVHD ou des maladies auto-immunes.

### 5.3.2. Les cellules T régulatrices dans le contrôle de la GVHD

Les cellules T régulatrices naturellement présentes dans le greffon jouent un rôle crucial dans le retard de l'apparition de la maladie de GVH. La déplétion des cellules T régulatrices du greffon accélère l'apparition de la maladie de GVH chez les souris comparativement à celles qui ont reçu un greffon total.<sup>97</sup> D'autres études montrent que l'infusion d'un nombre égal de cellules T régulatrices fraîches (isolées de la moelle osseuse, la rate et des nodules lymphatiques) et T conventionnelles pendant la greffe prévient la maladie de GVH et ceci dans différentes combinaisons génétiques entre les souris donneuses et les souris receveuses.<sup>98,99</sup>

Puisque dans la maladie de GVH il est important de dissocier l'effet bénéfique de l'effet délétère des cellules T, et que l'effet suppresseur des cellules T régulatrices est spécifique de l'antigène reconnu par leur TCR, ceci a rendu possible la sélection des cellules T régulatrices spécifiques de certains alloantigènes. Les cellules T régulatrices du donneur peuvent donc être mises en cultures avec les cellules présentatrices d'antigènes (APC) du receveur. Ainsi seuls les T régulatrices reconnaissant ces APC, survivent et prolifèrent. Ces cellules T régulatrices induites à proliférer ex-vivo sont spécifiques des alloantigènes utilisés pour leur sélection puisqu'elles ne prolifèrent pas en présence des APC d'un autre receveur. Dans des modèles animaux de greffe de cellules souches hématopoïétiques, les études rapportent que l'addition des cellules T régulatrices spécifiques retarde l'incidence de la maladie de GVH.<sup>97</sup>

### 5.4. Élimination sélective des cellules T

Les cellules T du donneur sont les cellules effectrices médiant la GVH, et assurent une immunité anti-tumorale et anti-infectieuse. Comment séparer l'effet bénéfique de l'effet destructeur de ces cellules?

Récemment, des efforts ont été déployés pour éliminer la population des cellules T capables de médier une réponse immunitaire contre l'hôte et par la suite causer la maladie de GVH, tout en préservant les cellules T responsables de l'immunité anti-tumorale (effet greffon-versus-leucémie)(GVL) et anti-infectieuse.

Dans le cas de transplantations compatibles (apparentées ou non apparentées) au niveau du complexe HLA, des stratégies ciblant les cellules CD6+ et CD8+ se sont démontrées efficaces dans la prévention de la maladie de GVH.<sup>100-102</sup> De plus, l'effet GVL partiellement bloqué par l'élimination des sous-populations de cellules T pourrait être restauré par l'infusion de lymphocytes T du donneur. Cette administration de cellules T doit cependant être effectuée lorsque le patient est à faible risque de GVHD.<sup>103</sup>

Dans le cas d'un système de transplantation incompatible au niveau du complexe HLA, les différences antigéniques entre le donneur et le receveur sont particulièrement immunogéniques, et il est extrêmement difficile d'identifier à priori les cellules T qui peuvent reconnaître les différences au niveau du CMH et les séquences peptidiques exprimées sur les tissus de l'hôte. Cependant lorsque les cellules du donneur sont exposées à celles de l'hôte in vitro, les cellules T capables de reconnaître les molécules du CMH du receveur deviennent activées, et subissent des changements biochimiques et antigéniques rendant ces cellules "visibles".

Des stratégies utilisant des anticorps monoclonaux ont été développées pour éliminer ces cellules alloréactives, cependant elles peuvent être accompagnées d'une élimination non spécifique d'autres cellules T bénéfiques à l'organisme. Par exemple, l'utilisation de l'anticorps CD25 pourrait éliminer non seulement les cellules T activées mais aussi les cellules T régulatrices qui ont un rôle majeur dans le contrôle de la GVHD.<sup>104-108</sup>

Comme toutes les méthodes conventionnelles de prévention et de traitement de la GVHD utilisées jusqu'à maintenant ne sont que partiellement efficaces et souvent accompagnées d'effets secondaires, il est important d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques. Dans notre laboratoire, nous nous attaquons à l'une des principales problématiques liées à la greffe de moelle osseuse, la GVHD. Nos études visent à prévenir et à traiter la GVHD par la PDT en utilisant une nouvelle molécule photosensible, la 4-5 dibromorhodamine ou TH9402. Une thérapie photodynamique impliquant cet agent a été développée dans notre laboratoire et permet d'éliminer spécifiquement les cellules T alloréactives.

## 6. La thérapie photodynamique avec le TH9402

### 6.1. Introduction

La première génération de molécules photosensibles à être utilisées en clinique a principalement fait appel à un dérivé de l'hématoporphyrine (photofrine) utilisé dans le traitement des cancers de l'œsophage et du poumon.<sup>109</sup> Cet agent est approuvé en clinique, mais l'inconvénient de ce composé est sa persistance cutanée prolongée dans l'organisme, sa complexité et son faible coefficient d'absorption même à une longueur d'onde de 630 nm.

Ces limites ont encouragé le développement de molécules photosensibles avec des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques améliorées. La deuxième génération de molécules photosensibles comptait sur une variété de composés dont les dérivés de la benzoporphyrine, les chlorines, les phtalocyanines, les texaphrines, les hypericines, la rhodamine et les molécules photosensibles endogènes comme la protoporphyrine IX (PP) générée après l'administration du précurseur de la porphyrine, l'acide  $\delta$ -amino lévulinique (ALA).

La troisième génération de molécules photosensibles est dérivée de l'acide  $\delta$ -aminolévulinique. Afin d'augmenter leur spécificité pour les tissus néoplasiques, les molécules photosensibles peuvent couplées à des anticorps monoclonaux, des liposomes ou des ligands.

Parmi ces générations de molécules photosensibles, la rhodamine-123 a prouvé son efficacité à se localiser dans les cellules cancéreuses.

Malgré sa faible toxicité, son élimination rapide et sa faible rétention au niveau des cellules souches hématopoïétiques, l'utilisation thérapeutique de la rhodamine-123 dans la thérapie photodynamique est limitée à cause de sa faible transformation en état d'excitation triplet. Un groupe de chimistes et biologistes à l'Université de Montréal ont développé une série de dérivés de la rhodamine et étudié leurs propriétés physico-chimiques et pharmacologiques afin d'identifier des dérivés photosensibles avec un potentiel important de cytotoxicité. Parmi plusieurs composés dérivés de la rhodamine-123, le 4,5-dibromorhodamine méthyl ester ou TH9402 s'est révélé un agent photosensible particulièrement intéressant. Il a été sélectionné pour sa faible toxicité, sa

stabilité, et son efficacité à produire des singlets d'oxygènes.<sup>110</sup> La capacité du TH9402 à produire des singlets d'oxygènes se traduit par une élimination efficace des cellules tumorales.<sup>70,111</sup>

La destruction sélective des cellules non désirées tumorales ou hyper prolifératives dépend non seulement de la production des singlets d'oxygène mais de la cinétique d'influx et d'efflux du colorant afin de générer un profil de rétention favorisant l'élimination des cellules cibles. La PDT avec le TH9402 s'est révélée efficace dans le contexte d'une utilisation impliquant des caractéristiques précises d'incubation, d'efflux et d'illumination. Ce traitement implique une phase de coloration pendant laquelle les cellules traitées sont exposées au TH9402 qui s'incorpore graduellement dans toutes les cellules, atteignant un maximum d'incorporation après environ 40 min. À la fin de la phase de coloration, la quantité du TH9402 retenue dans les cellules tumorales de leucémie myéloïde chronique ou de lymphome non-Hodgkinien est beaucoup plus importante que celle qui retrouvée dans les cellules normales.<sup>111,112</sup>

Cette phase de coloration est suivie d'une phase d'efflux permettant au TH9402 de sortir des cellules normales tandis que la majorité du colorant est encore retenu dans les cellules tumorales. L'exposition des cellules à la lumière visible de longueur d'onde de 514 nm permet l'éradication de 99.9 à 99.99%, donc de 2 à 3 logs, de cellules tumorales dans des conditions qui préservent la majorité des progéniteurs hématopoïétiques comme les "colony forming unit-granulocyte monocyte" (CFU-GM), les "burst forming unit-erythroid" (BFU-E) et les "colony forming unit-granulocyte erythroid monocyte megakaryocyte" (CFU-GEMM).



## **6.2. Application clinique de la PDT avec le TH9402**

### **6.2.1. La purge *ex vivo* dans la greffe de moelle osseuse autologue**

La greffe de cellules souches autologue est utilisée couramment pour le traitement de patients atteints de leucémies, lymphomes et plusieurs autres maladies hématologiques. Elle induit souvent une rémission des patients. Ces derniers demeurent cependant à risque de rechute et l'infiltration du greffon par des cellules malignes représente un facteur de risque significatif pour la rechute.

La méthode de purge *ex vivo* vise à éliminer les cellules cancéreuses du greffon tout en préservant les progéniteurs hématopoïétiques normaux. Or les études effectuées dans notre laboratoire avec le TH9402 ont démontré son efficacité à éliminer les cellules leucémiques (élimination de 99.99% dans des conditions de traitement qui préservent plus que la moitié des progéniteurs normaux). Ces résultats se sont révélés reproductibles dans diverses maladies dont la leucémie myéloïde chronique, et le lymphome non hodgkinien à cellules B.<sup>111-113</sup>

### **6.2.2. Efficacité de la PDT avec le TH9402 à éliminer les cellules immunoréactives humaines : stratégie pour traiter la GVHD ?**

Les travaux effectués par Guimond et al dans notre laboratoire<sup>73</sup> ont montré qu'il est possible d'éliminer sélectivement les cellules T humaines par la PDT avec le TH9402 et ceci grâce à la modulation intrinsèque d'une protéine de transport, soit la glycoprotéine P (Pgp) codée par le gène Multi-Drug-Resistance-1 (MDR-1). Pgp est un transporteur capable d'expulser la rhodamine-123 et de nombreux agents de chimiothérapie à l'extérieur de la cellule, d'où son rôle majeur dans la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie. Or les travaux de M. Guimond ont démontré que cette glycoprotéine est aussi impliquée dans le transport du TH9402 vers l'extérieur. Le processus d'activation cellulaire bloque MDR1, ce qui mène à la diminution de l'efflux du TH9402 et à l'élimination des populations lymphoïdes activées CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui retiennent ainsi une quantité accrue de TH9402. Ceci a été confirmé en évaluant l'élimination des cellules activées qui expriment le récepteur de haute affinité de l'Il-2. Ainsi la PDT permet une élimination efficace des précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques dirigés spécifiquement contre l'hôte. Cependant, MDR-1 reste actif dans

les cellules T au repos, ce qui explique qu'elles soient épargnées par la PDT. La PDT permet non seulement d'épargner les cellules T au repos mais de préserver leur capacité à générer une réponse proliférative contre des antigènes différents du CMH de l'hôte.

Dans le cadre de la maladie de GVH, la PDT pourrait être une stratégie attrayante pour la sélection des cellules T réactives contre les molécules de CMH du non-soi.<sup>114</sup> Notre laboratoire s'intéresse à la prévention et au traitement de la maladie de GVH par la thérapie photodynamique avec le TH9402 et aux mécanismes impliqués dans ces effets. Mon projet de maîtrise a donc consisté à étudier l'impact de la PDT sur les différentes populations lymphocytaires afin d'élucider les mécanismes impliqués dans le contrôle de la GVHD par la PDT et d'optimiser son utilisation.

## 7. Description du projet de maîtrise

Les travaux dirigés par le Dr. Roy ont permis de découvrir un phénomène intéressant qui est impliqué dans la sélectivité de la thérapie photodynamique utilisant le TH9402 et la lumière visible de longueur d'onde de 514 nm.<sup>73</sup>

Grâce à la modulation de la Pgp, la PDT permet une élimination sélective des cellules T alloréactives stimulées contre les antigènes du CMH du non-soi, tandis qu'elle épargne les cellules T non activées capables de générer une réponse immunitaire contre les antigènes du CMH de tiers. Le fait de dissocier l'effet bénéfique de l'effet délétère des cellules T pourrait donc avoir un intérêt clinique pour la prévention et le traitement de la maladie de GVH.

Ces travaux nous ont poussé à évaluer l'efficacité de cette thérapie dans un modèle murin de prévention de la maladie de GVH. Il a été récemment démontré dans notre laboratoire que la transfusion de cellules T alloréactives générées après activation *in vitro*, par une réaction mixte lymphocytaire (donneur contre receveur), puis traitées par la PDT avec le TH9402 prévient la maladie de GVH aigüe dans un modèle murin.<sup>115</sup> Cette même étude a montré que la PDT permet non seulement de dépléter les lymphocytes T alloréactifs responsables de la maladie de GVH mais d'induire une reconstitution immunitaire et hématologique adéquate à 100 jours post-greffe.

Le but de mon projet était d'évaluer l'impact de la thérapie photodynamique sur les différentes populations cellulaires retrouvées dans le greffon, soit les lymphocytes B, les lymphocytes T (CD4 et CD8) au repos, les lymphocytes T (CD4 et CD8) activées, les cellules NK au repos, les cellules NK activées et les lymphocytes T régulatrices. Parallèlement, j'ai étudié les mécanismes (apoptose *versus* nécrose) de la mort induite par la PDT dans ces différentes populations. Ceci permettra de mieux comprendre les mécanismes qui mènent à la prévention de la GVHD.

Finalement, j'ai procédé à une optimisation du procédé de thérapie photodynamique en adoptant différentes stratégies de traitement et ce, afin d'améliorer la procédure de traitement et de la rendre plus accessible dans son application clinique.

## **Matériel et méthodes**

### **1. Souris**

Les souches de souris C57BL/6J (B6) (H-2<sup>b</sup>) et C3H/HeJ (C3H) (H-2<sup>k</sup>) utilisées pour la réalisation de ce projet proviennent du Laboratoire Jackson (Bar Harbor, Maine, EU). Les souris étaient hébergées dans l'animalerie du centre de recherche Guy-Bernier de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont dans des conditions environnementales (température, humidité, ventilation, éclairage, nourriture et eau stériles) respectant les normes exigées par le comité canadien pour la protection des animaux. Les souris utilisées étaient âgées de 8 à 12 semaines.

### **2. Préparation des splénocytes**

Après avoir sacrifié les souris B6 et C3H, par dislocation cervicale, les rates ont été prélevées stérilement. Les splénocytes ont été extraits en écrasant les rates délicatement entre deux lamelles pour ne pas endommager les cellules. Après avoir effectué une préparation cellulaire homogène, les splénocytes sont lavés avec du RPMI 1640 et les globules rouges sont lysés avec une solution de lyse composée de Tris (0.17 M) NH<sub>4</sub>CL (0.16 M) à pH 7.65. Chaque rate est traitée avec 1 ml de la solution de lyse pendant une minute à la température de la pièce. Les cellules sont resuspendues après deux lavages (10 min à 1200 rpm) dans un milieu de culture : RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) supplémenté avec 10 % FBSI (sérum de veau fœtal décomplémenté, Hyclone Laboratories, Logan, UT), 100 U/ml pénicilline G, 100 µg/ml streptomycine, 2 mmole L-glutamine (Gibco, Grand island, NY).

Le nombre de splénocytes et la viabilité cellulaire ont été évalués par un décompte à l'acide acétique et au bleu de trypan, respectivement.

### 3. Activation des splénocytes *in vitro*

Pour toutes les cultures cellulaires, les splénocytes de souris B6 et C3H ont été resuspendus dans du RPMI supplémenté avec 10 % FBSI décomplémenté, 100 U/ml penicilline G, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycine, 2 mmole L-glutamine et 5  $\mu\text{M}$  2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). L'incubation a été effectuée à 37°, 5 %  $\text{CO}_2$  dans un atmosphère humidifié.

Pour l'activation avec la concanavaline-A (Con A), les splénocytes provenant de plusieurs souris ont été mélangés pour former une suspension homogène. Les cellules ont ensuite été mises en culture dans des flasques pendant 48 h à une concentration de  $2.5 \times 10^6$  cellules/ml avec 2  $\mu\text{g/ml}$  concanavaline A (Sigma). Le milieu a été supplémenté avec 50 U/ml interleukine-2 (rhIL-2, R&D System, Minneapolis, MN).

Pour les réactions mixtes lymphocytaires (MLR), les splénocytes de souris C57BL/6J (H-2<sup>b</sup>) ont été mis en culture dans des flasques à une concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/ml avec un nombre égale de splénocytes stimulatrices C3H/HeJ (H-2<sup>k</sup>) irradiées (25 Gy d'une source  $^{137}\text{Cs}$  de rayon gamma, Atomic Energy of Canada, Ottawa, ON) pour 4 jours. Le milieu est supplémenté par 50 U/ml interleukine-2.

#### 4. Thérapie photodynamique (PDT)

Les cellules de rates non activées ou activées *in vitro* ont été lavées et resuspendues à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu de coloration X-vivo 15 (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) supplémenté avec 2,5 % FBSI. Les cellules ont été mises en présence de 10  $\mu$ M TH9402 (Celmed BioScience, Montréal, Canada) pour une période de 40 min et incubées à 37°C. La phase de coloration permet aux cellules d'intégrer le TH9402. Après avoir fait un lavage (10 min à 1200 rpm) les cellules ont été resuspendues dans un milieu d'extrusion X-vivo supplémenté avec 10 % FBSI, cette phase d'efflux de 50 min permet à l'excès du TH9402 de sortir des cellules. À la fin de la période de coloration et/ou de l'extrusion un échantillon a été prélevé afin d'évaluer la concentration intracellulaire du TH9402 par cytométrie en flux. À la fin de la période d'efflux, les cellules ont été mises dans des flasques et exposées à une énergie lumineuse de 5 J/cm<sup>2</sup> à une longueur d'onde de 514 nm sous une épaisseur de 1.3 mm (PDT-Xreox Series 4, Celmed BioScience). Suite à la PDT, les cellules ont été lavées et remises en culture. Les cellules activées ainsi que les cellules B et NK ont été mises en culture dans du RPMI 1640 supplémenté avec 5 U/ml et 50 U/ml d'IL-2, respectivement.

#### 5. Analyse immunophénotypique : cytométrie en flux

L'expression des récepteurs de surfaces des cellules T (CD4 et CD8) activées et quiescentes, cellules B, NK et Treg (T régulateurs), a été évaluée par immunofluorescence utilisant les techniques standardisées de cytométrie en flux. Les cellules traitées par la PDT ainsi que les cellules contrôles ont été marquées avec les anticorps suivants : anti-CD8a (rat IgG<sub>2a</sub>, ?), anti-CD4 (rat IgG<sub>2a</sub>, ?), anti-THY1.2 (rat IgG<sub>2b</sub>), anti-B220 (rat IgG<sub>2a</sub>, ?), anti-NK1.1 (rat IgG<sub>2a</sub>, ?), anti-CD44 (rat IgG<sub>2a</sub>, ?) (BD Pharmingen, San Diego, EU), anti-CD25 (rat IgG<sub>1</sub>) (Cedarlane Labs, Hornby, Ontario, Canada), AnnexineV (AnnV) et le 7-actinomycine-D (7AAD) (BD Pharmingen). Afin d'évaluer le marquage non spécifique des anticorps, des isotopes conjugués aux fluorochromes appropriés ont été utilisés dans toutes les analyses de cytométrie en flux.

Pour étudier le mécanisme de la mort induite par la PDT, les cellules ont été simultanément marquées par l'annexine V qui est un marqueur précoce de l'apoptose et le 7-AAD qui pénètre les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire.

Les marquages sont faits avec  $5 \times 10^5$  cellules par échantillon, au moins  $2 \times 10^4$  événements sont enregistrés par un cytomètre multi-paramétrique (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA). Les analyses sont effectuées en utilisant le programme Cell Quest (Becton Dickinson).

## **6. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices**

### **6.1. Purification des cellules $CD4^+CD25^+$**

Des suspensions cellulaires homogénéisées ont été préparées à partir des rates de souris B6. La purification des cellules  $CD4^+CD25^+$  a été faite en deux étapes. Les splénocytes ont d'abord été enrichis en cellules  $CD4^+$  par une sélection négative effectuée selon les instructions du protocole EasySep (StemCell Technologies, Vancouver, BC) qui est résumé dans le prochain paragraphe.

Les cellules ont été resuspendues à la concentration de  $80 \times 10^6$  cellules/ml dans du PBS à 2 % FBSI et marquées par un cocktail d'anticorps couplés à la biotine (CD11b (Mac1), CD-45 R (B220), CD8, LY-6G (Gr1)) pour 15 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées et un complexe tétramérique d'anticorps anti-biotine a été ajouté aux cellules (4°C pour 15 minutes). Ce complexe étant bio-spécifique, il reconnaît d'une part la biotine et de l'autre les particules de dextran. Les particules de dextran ont été additionnées aux cellules (15 minutes à la température ambiante). Le passage des cellules sur une colonne magnétique (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) permet la séparation des cellules  $CD4^+$  des autres populations non désirées. La fraction de cellules non retenue sur la colonne magnétique est la fraction de cellules  $CD4^+$ . Pour évaluer la pureté des cellules  $CD4^+$ , un marquage a été effectué avant et après la sélection.

Après avoir marqué les cellules  $CD4^+$  avec un Ac anti-CD25-PE, elles ont été triées par FACS en deux fractions :  $CD4^+CD25^+$  et  $CD4^+CD25^-$ . Nous avons évalué la capacité des cellules  $CD4^+CD25^-$  à proliférer lorsque exposées à différentes populations cellulaires.

## 6.2. Réaction mixte lymphocytaire et essai de prolifération

L'évaluation de la fonction suppressive des cellules  $CD4^+CD25^+$  a été effectuée par une réaction mixte lymphocytaire.

Les cultures ont été faites en duplicata dans des plaques à 96 puits dans un volume total de 200  $\mu$ l par puit. Un nombre fixe de cellules effectrices  $CD4^+CD25^-$  de souris B6 ( $10^5$  cellules) et de cellules stimulatrices allogéniques irradiées (3000 cGy) C3H déplétées en cellules T ( $10^5$  cellules) ont été mises en culture 5 jours avec un nombre variable de cellules T régulatrices  $CD4^+CD25^+$  de souris B6 pour obtenir les ratios décrits dans les figures et les légendes étudiant la fonction suppressive des cellules Treg. Le milieu est supplémenté par 50 U/ml d'IL-2. La prolifération des cellules a été évaluée en mesurant l'incorporation de la thymidine (1  $\mu$ Ci/puit  $^3$ H) après 16 heures d'incubation.

Pour évaluer l'effet de la PDT sur les cellules T régulatrices, la même expérience a été répétée mais en utilisant des cellules T régulatrices traitées à la PDT dans les conditions de traitement déjà utilisées dans notre laboratoire (10  $\mu$ M TH9402/ 40 min. d'incubation/ 50 min. d'efflux/ 5 J/cm<sup>2</sup>/  $1 \times 10^6$  cellules par ml/ 1.3 mm d'épaisseur). Les cellules T régulatrices non traitées à la PDT ont été utilisées comme cellules contrôle.

### 6.2.1. Déplétion des cellules T

Les splénocytes de souris C3H ont été déplétés en cellules T avant de les utiliser comme cellules stimulatrices dans les essais de prolifération et ceci a été effectué à l'aide des anticorps Anti-Thy1.2. Ainsi, après avoir lysé les globules rouges, les splénocytes ont été resuspendus à la concentration de  $1 \times 10^7$  cellules/ml dans du RPMI 1640 supplémenté avec 5% FBSI, 100 U/ml pénicilline G, 100  $\mu$ g/ml streptomycine. Les cellules de la rate ont ensuite été incubées à 4°C pendant une heure avec un anticorps de lapin anti-Thy1.2 dirigé contre les cellules T murines (Cedarlane Labs). Après lavage avec du RPMI 1640, les cellules ont été incubées à 37°C pour 1 heure avec le sérum de lapin utilisé comme source de complément (Low-Tox-M rabbit complément, Cedarlane Labs). L'efficacité



de la déplétion des cellules T a été analysée par cytométrie en flux utilisant un anticorps anti-Thy1.2.

## **7. Optimisation du procédé de traitement photodynamique**

La deuxième partie du projet a été consacrée à l'optimisation de la thérapie photodynamique. Nous avons évalué l'effet de faibles doses de TH9402 (0.5 à 2  $\mu$ M) mais sans la période d'efflux sur l'élimination des cellules T activées et ceci afin de :

- Augmenter la simplicité du traitement : la thérapie photodynamique est une procédure relativement longue comprenant plusieurs étapes successives, qui rendent son application clinique difficile surtout quand le nombre de cellules à traiter est élevé.
- Augmenter la sélectivité du traitement, donc diminuer la cytotoxicité de la PDT sur les cellules T au repos tout en éliminant le maximum de cellules T activées.
- Éliminer le maximum de cellules T activées par apoptose.

Pour déterminer si la spécificité de la thérapie photodynamique reflète la capacité des cellules T activées à accumuler préférentiellement les faibles doses du TH9402, nous avons débuté nos investigations en mesurant la cinétique de rétention du TH9402 dans différentes populations cellulaires. Nous avons ainsi évalué l'incorporation du TH9402 dans les splénocytes totaux activés avec la Con A et les splénocytes au repos, à différentes concentrations (0.5, 1, 2  $\mu$ M) et à différents temps d'incubation. Nous avons mesuré la cinétique d'incorporation du TH9402 dans les cellules CD4 et CD8 activées dans une réaction mixte lymphocytaire (MLR).

Les méthodologies utilisées dans cette partie du projet ont toutes été décrites précédemment dans cette section. Les conditions du traitement seront représentées dans l'ordre suivant : concentration du TH9402 / temps de coloration/ énergie lumineuse/ épaisseur/ concentration cellulaire.

## 8. Analyse statistique

Les différences statistiques ont été évaluées en utilisant le Student *t* test. Les différences furent considérées significatives à  $P \leq 0.05$ .

## **Troisième partie**

### **RÉSULTATS**

## **Résultats**

Dans ce présent ouvrage, les résultats sont présentés en pourcentage (%) et ceci en faisant le rapport entre le nombre ou le pourcentage de cellules viables dans l'échantillon traité (T) et le nombre ou le pourcentage de cellules viables dans l'échantillon non traité (NT). Ce pourcentage de cellules viables est calculé de la façon suivante :  $T / NT \times 100$ . Le pourcentage d'éradication est alors obtenu en soustrayant ce rapport de 100%.

### **1. Effet de la thérapie photodynamique (PDT) sur les splénocytes activés**

#### **1.1. Élimination spécifique des cellules T activées par la PDT**

L'efficacité de la PDT à éliminer les cellules T activées dépend de leur capacité à incorporer le TH9402. Des expériences de cinétique qui évaluent l'incorporation du TH9402 dans les cellules T activées et non activées ont été faites. Ces expériences impliquent différents temps de coloration et d'extrusion afin de déterminer les conditions optimales de traitement (10  $\mu$ M TH9402, 40 minutes de coloration, 50 minutes d'extrusion, 5 J/cm<sup>2</sup>) qui montrent une accumulation préférentielle du TH9402 dans les cellules T activées.

Afin d'étudier l'impact de la thérapie photodynamique sur les cellules T activées, les cellules de rates de souris B6 sont activées *in vitro* avec la concanavaline A (Con A) et traitées à la PDT 48 h après l'activation. La viabilité des cellules traitées et non traitées est évaluée par cytométrie en flux par le biais des marqueurs annexine (AnnV) et 7-actinomycine D (7-AAD) à 1h, 4h et 24h suivant la thérapie photodynamique. Les cellules viables sont les cellules AnnV- 7AAD-.

##### **1.1.1 Effet de la PDT sur les lymphocytes CD4<sup>+</sup> activés**

L'application des conditions de traitement mentionnées ci-dessus sur les cellules de rates activées montre que la PDT exerce un effet important sur les cellules T activées CD4 positives. Cet effet est d'autant plus remarquable entre les cellules traitées et non traitées avec l'augmentation du temps post-PDT. Une heure après la PDT, une

proportion significative de 61.7% des cellules  $CD4^+CD44^+$  et de 63.0% des cellules  $CD4^+CD25^+$  sont encore viables par rapport au contrôle. L'impact maximal exercé par la PDT sur les cellules activées est observé 24h après le traitement. En effet, on constate une élimination significative de l'ordre de 97% des cellules  $CD4^+CD44^+$  et  $CD4^+CD25^+$  soit seulement 2.9 % de cellules viables (Fig. 1).

### 1.1.2 Effet de la PDT sur les cellules CD8 activées

Les cellules CD8 activées exprimant les récepteurs CD44 et CD25 ont également une grande sensibilité à la PDT. L'élimination de ces cellules commence dans l'heure qui suit le traitement. On remarque une diminution significative de presque la moitié du nombre de cellules viables  $CD8^+CD44^+$  (52.4%) et  $CD8^+CD25^+$  (57.7%) dans l'échantillon traité par rapport au contrôle. À 24h, la grande majorité des cellules  $CD8^+CD44^+$  et  $CD8^+CD25^+$  est significativement éliminée avec un pourcentage de cellules viables restantes de 3.6 % ( $CD44^+$ ) et 1.8% ( $CD25^+$ ) chez les cellules traitées comparativement aux non traitées. (Fig. 2).

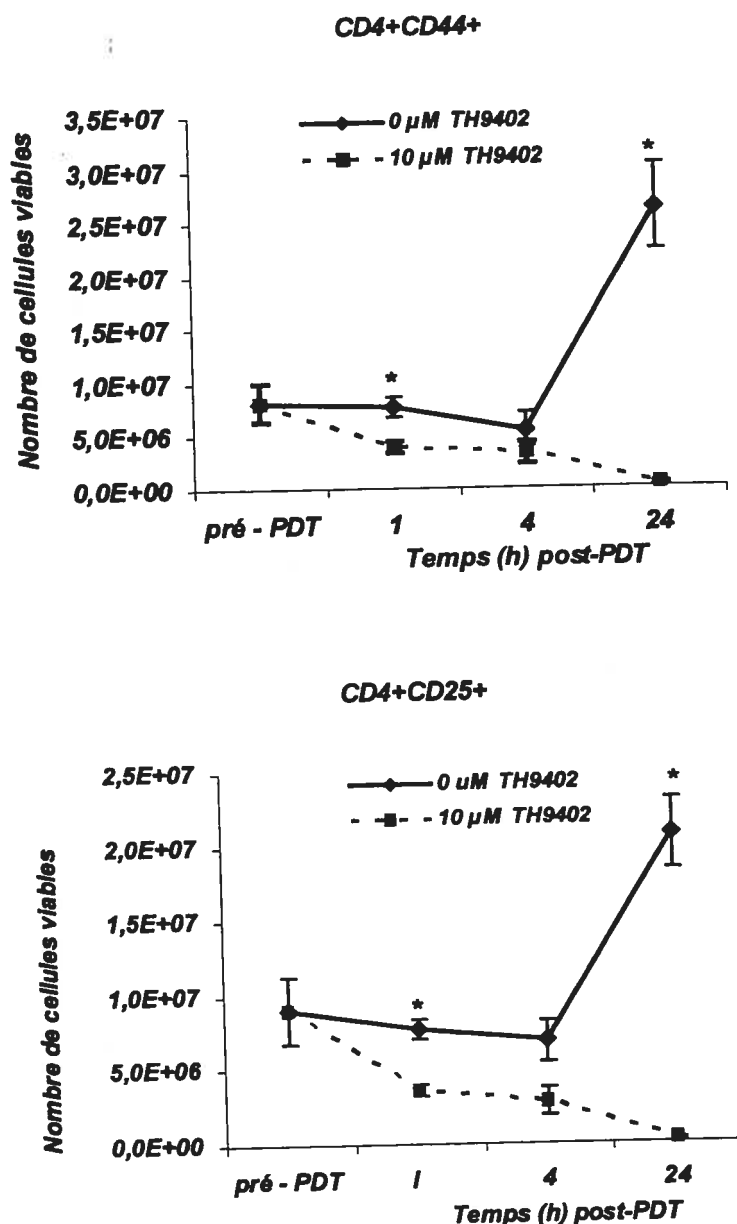
### 1.2. Effet de la PDT sur les cellules NK activées.

L'effet de la PDT sur les cellules NK après activation des cellules de la rate avec la Con A apparaît immédiatement. À 1h et 4h post PDT, une élimination significative est observée avec seulement 23 % et 30 %, respectivement, de cellules NK viables restant dans l'échantillon traité par rapport à celui non traité. L'effet de la PDT sur les cellules NK est majeur à 24h où la PDT élimine plus de 90 % des cellules NK comparativement au contrôle. (Fig. 3)

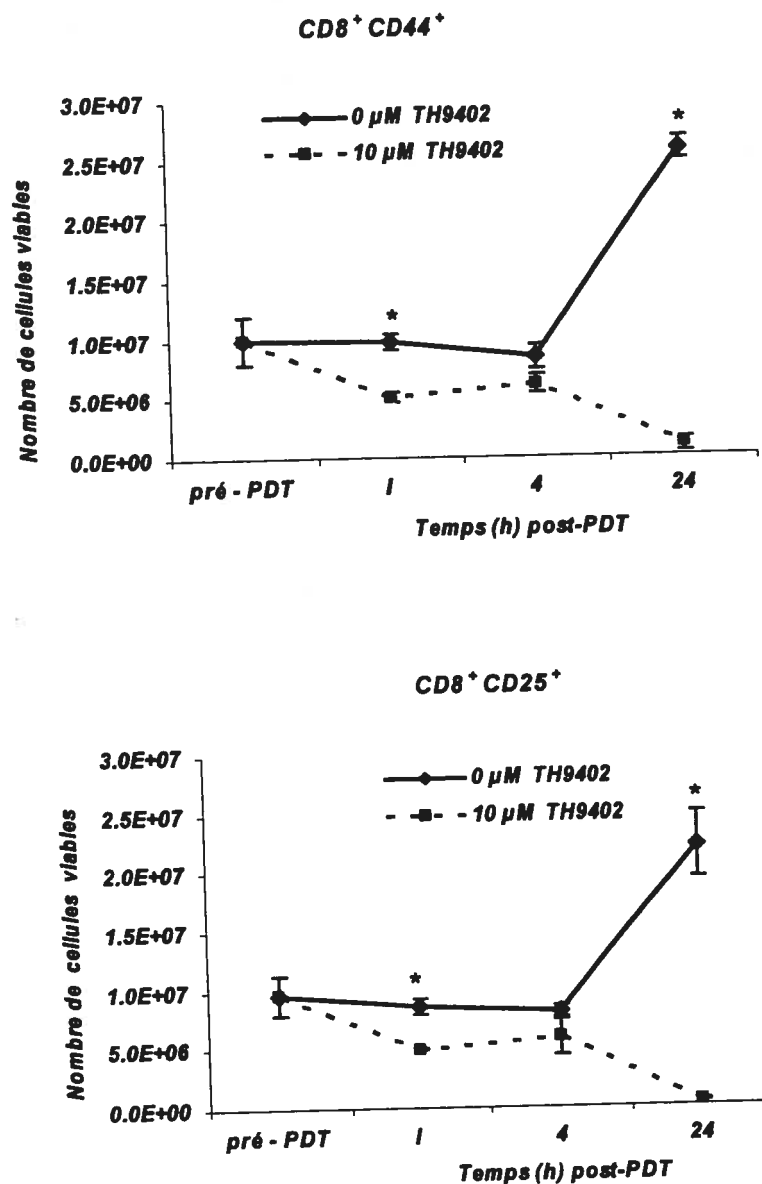
Les lymphocytes T, qu'ils soient  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ , et les cellules NK activées à la Con A 48 heures sont particulièrement sensibles à la PDT. Toutefois, les cellules NK semblent être éliminées plus tôt soit dans les premières heures (1h et 4h) suivant le traitement en comparaison avec les lymphocytes T activées. Malgré cela, tous les types cellulaires sont majoritairement éliminés à 24h suivant le traitement.

Comme nous ne pouvons pas restreindre l'effet de la PDT sur les cellules T et NK activées, nous avons voulu aussi déterminer son effet sur les autres lignées cellulaires

non activées soit les lymphocytes B, les cellules NK ainsi que les lymphocytes T CD4 et CD8 au repos.

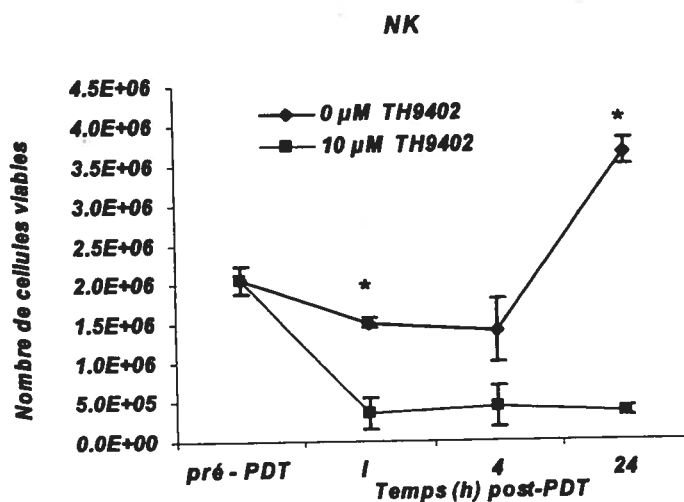


**Figure 1. Effet de la PDT sur des splénocytes activés.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 48h avec la Con A puis traités à la PDT dans les conditions suivantes : 10 $\mu$ M TH9402 / 40 min / 50 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le nombre de cellules CD4 viables a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4h et 24h. Les deux marqueurs d'activations CD44 et CD25 ont été étudiés. Des cellules contrôles également activées avec la Con A ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière. \*P < 0.05, (n=3).



**Figure 2. Effet de la PDT sur des splénocytes activés.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 48h avec la Con A puis traités à la PDT dans les conditions suivantes : 10μM TH9402 / 40 min / 50 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le nombre de cellules CD8 viables a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4h et 24h. Les deux marqueurs d'activations CD44 et CD25 ont été étudiés. Des cellules contrôles également activés avec la Con A ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière. \*P < 0.05, (n=3).





**Figure 3. Effet de la PDT sur des splénocytes activés.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 48h avec la Con A puis traités à la PDT dans les conditions suivantes : 10 $\mu$ M TH9402 / 40 min / 50 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le nombre de cellules NK viables a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4h et 24h. Les deux marqueurs d'activations CD44 et CD25 ont été étudiés. Des cellules contrôles également activés avec la Con A ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière. \*P  $\leq$  0.05, (n=3).

## 2. Effet de la PDT sur les cellules de rates non activées

Afin de vérifier si les lymphocytes B, les cellules NK ainsi que les lymphocytes T CD4 et CD8 au repos sont aussi affectées par la PDT, les mêmes conditions de traitement sont appliquées sur des cellules de rates B6 non activées. La viabilité des cellules traitées et non traitées est évaluée à différents temps post-PDT soit 1h, 4h et 24h suivant la thérapie photodynamique et ce par cytométrie en flux. Tout comme les cellules activées, les cellules viables sont ciblées par l'absence des marqueurs annexine V et 7-actinomycine D (AnnV- 7AAD-).

### 2.1. Effet de la PDT sur les lymphocytes T au repos

À 1h post PDT, l'élimination des lymphocytes CD4 et CD8 au repos n'est pas significative par rapport aux lymphocytes non traités. En effet, 75 % des cellules CD4<sup>+</sup> sont encore préservées et les CD8<sup>+</sup> sont pratiquement toutes conservées. Toutefois, le pourcentage de cellules viables CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> diminue significativement à 4h post-PDT pour atteindre 50% et 20%, respectivement, comparativement au contrôle non traité. À 24h, une proportion significative de cellules CD4<sup>+</sup> est éliminée soit de l'ordre de 60% mais seulement 33% des CD8<sup>+</sup> succombent au traitement par rapport au contrôle. (Fig. 4).

La PDT permet non seulement d'épargner les cellules T au repos mais de préserver leur capacité à générer une réponse proliférative lorsque exposées à la concanavaleine-A.

Ainsi des splénocytes de souris B6 traités par la PDT puis activés avec la Con-A montrent un pourcentage de cellules CD8 activées comparable au contrôle de splénocytes activés sans être traités par la PDT. Les cellules CD4 génèrent une réponse proliférative plus faible que celles observée dans l'échantillon contrôle. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'un plus grand nombre de cellules CD4 est éliminé par la PDT comparativement au nombre de CD8. (données non présentées).

Comme démontré précédemment, la PDT exerce un effet majeur sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activées, mais on peut aussi observer un impact sur les cellules T quiescentes, même si ces dernières s'avèrent moins sensibles que les cellules activées. De plus, on démontre un effet plus important de mort cellulaire induite par la PDT sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par rapport aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pour les cellules non

activées. Cette dernière observation n'a pas été mise en évidence pour les cellules activées, probablement à cause de leur plus grande sensibilité au traitement.

## **2.2. Élimination des cellules B par la PDT**

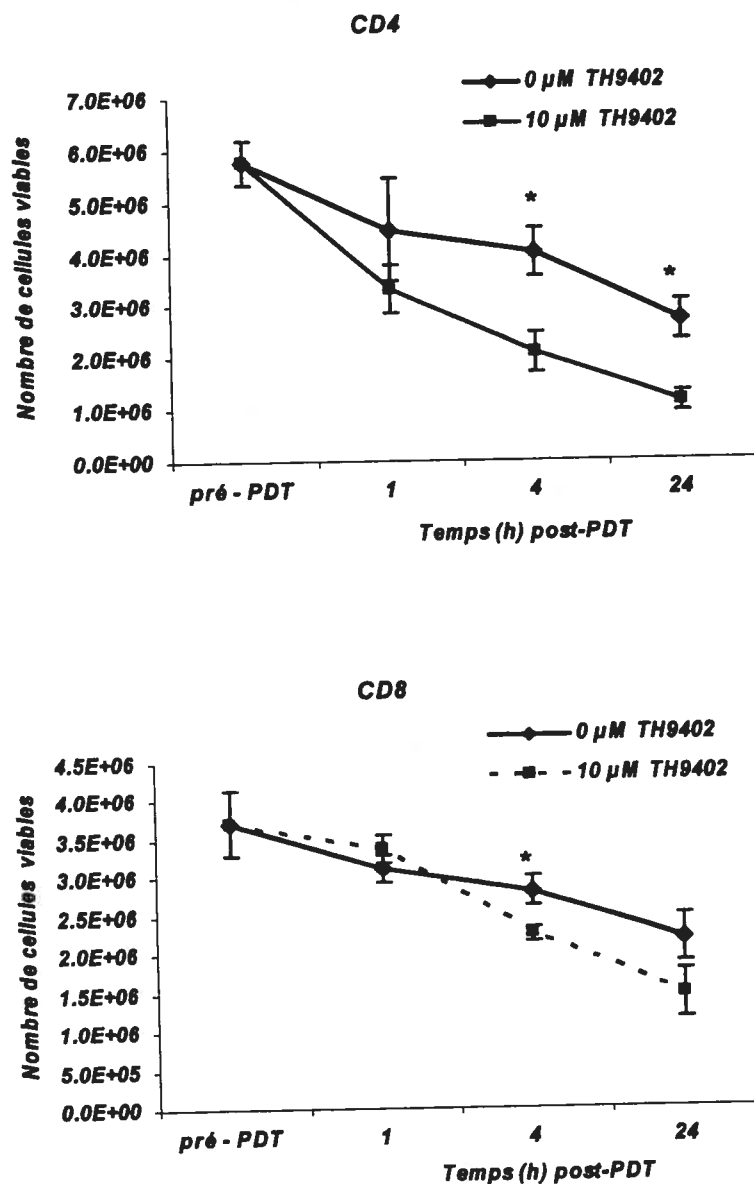
Parmi les cellules quiescentes de rates, les cellules B sont les plus sensibles à la PDT. En effet, l'impact du traitement sur les cellules B est immédiat. Ainsi dans l'heure qui suit la PDT, la grande majorité des cellules B est éliminée (93.5 %) et ce de façon significative. Cette élimination augmente avec le temps pour atteindre 99 % à 24h par rapport à l'échantillon non traité (Fig. 5).

## **2.3. Effet de la PDT sur les cellules NK.**

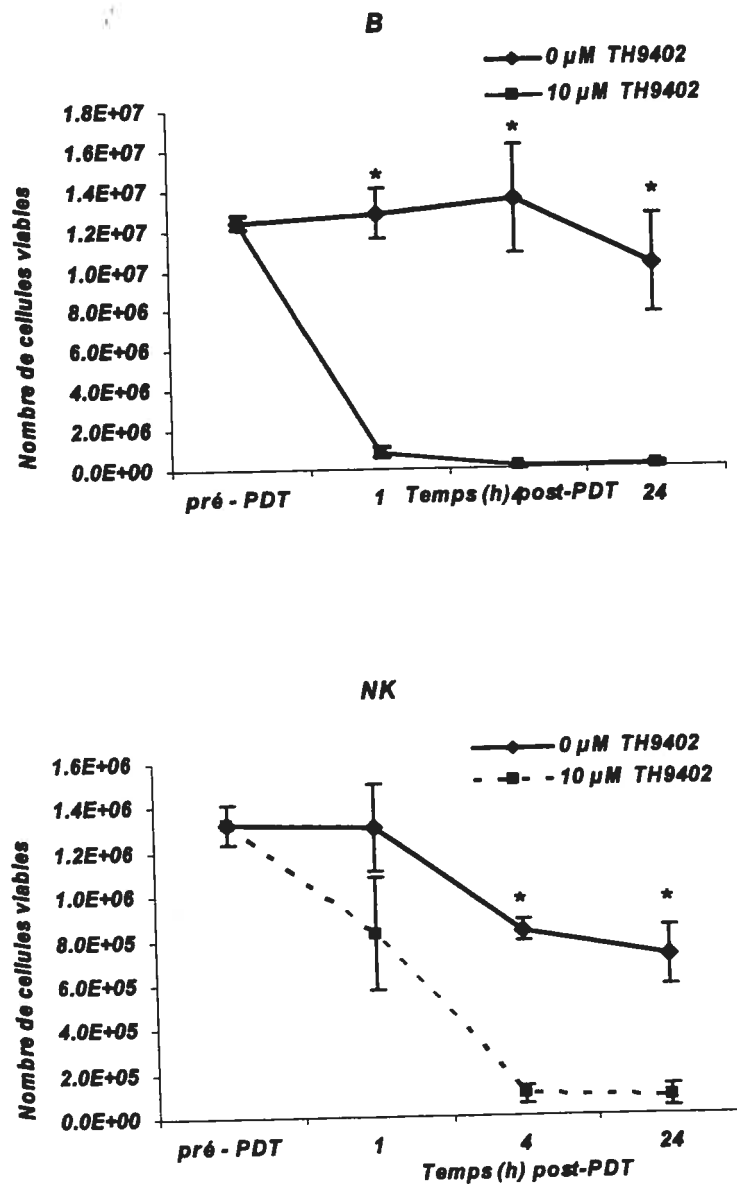
Les cellules NK sont plus résistantes que les cellules B. On constate que une heure après le traitement, la viabilité des cellules NK est encore importante ; seulement 37 % des cellules NK sont éliminés par rapport au contrôle. Mais la perte de ces cellules augmente significativement comparativement aux cellules non traitées pour atteindre 89% à 4h et à 24h post-PDT (Fig. 5).

Parmi les cellules non activées, les lymphocytes B et les cellules NK démontrent une plus grande sensibilité à la PDT comparativement aux cellules T. Même si ces dernières sont plus résistantes au traitement, on dénote que les conditions du traitement induisent malgré tout des dommages cellulaires qui sont plus marqués et précoces chez les lymphocytes CD4<sup>+</sup> que chez les lymphocytes CD8<sup>+</sup>.

On remarque qu'à 24h après la PDT, la diminution du nombre de cellules viables n'est pas dû seulement à la PDT, puisqu'on observe une diminution importante du nombre de lymphocytes T, lymphocytes B et cellules NK viables dans l'échantillon contrôle sans PDT.



**Figure 4. Effet de la PDT sur les splénocytes quiescents.** Des splénocytes de souris B6 fraîchement prélevés ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 10 $\mu$ M TH9402 / 40 min / 50 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml / 1.3 mm. Le nombre de cellules CD4 et CD8 viables a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4h et 24h. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière. \*P  $\leq$  0.05, (n=3).



**Figure 5. Effet de la PDT sur les splénocytes quiescents.** Des splénocytes de souris B6 fraîchement prélevés ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 10 $\mu$ M TH9402 / 40 min / 50 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml / 1.3 mm. Le nombre de cellules B et NK viables a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4h et 24h. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière. \*P  $\leq$  0.05, (n=3).

### 3. Mécanismes de la mort induite par la PDT

Étant donné l'efficacité du traitement à éliminer les lymphocytes T, B et cellules NK activées et quiescentes, nous avons voulu déterminer quels étaient les mécanismes de la mort de ces différentes populations cellulaires.

Des marquages effectués avant et après la PDT sur des splénocytes activés et non activés nous ont permis d'évaluer si la mort cellulaire était de type apoptotique ou nécrotique. Les marqueurs utilisés furent l'annexine V (AnnV) qui marque les cellules en apoptose et le 7-actinomycine D (7-AAD) qui se lie aux cellules mortes. On a ainsi pu mettre en évidence les différents groupes de cellules selon leur mode de mort cellulaire : les cellules viables ( $\text{AnnV}^-$  7-AAD $^-$ ), les cellules apoptotiques ( $\text{AnnV}^+$  7-AAD $^-$ ), les cellules dont le mécanisme de mort reste indéterminé ( $\text{AnnV}^+$  7-AAD $^+$ ) et les cellules nécrotiques, qui ont démontré un marquage par 7-AAD sans avoir été précédé d'une positivité à l'annexine V ( $\text{AnnV}^-$  7-AAD $^+$ ).

#### 3.1 Mécanismes de mort des splénocytes activées

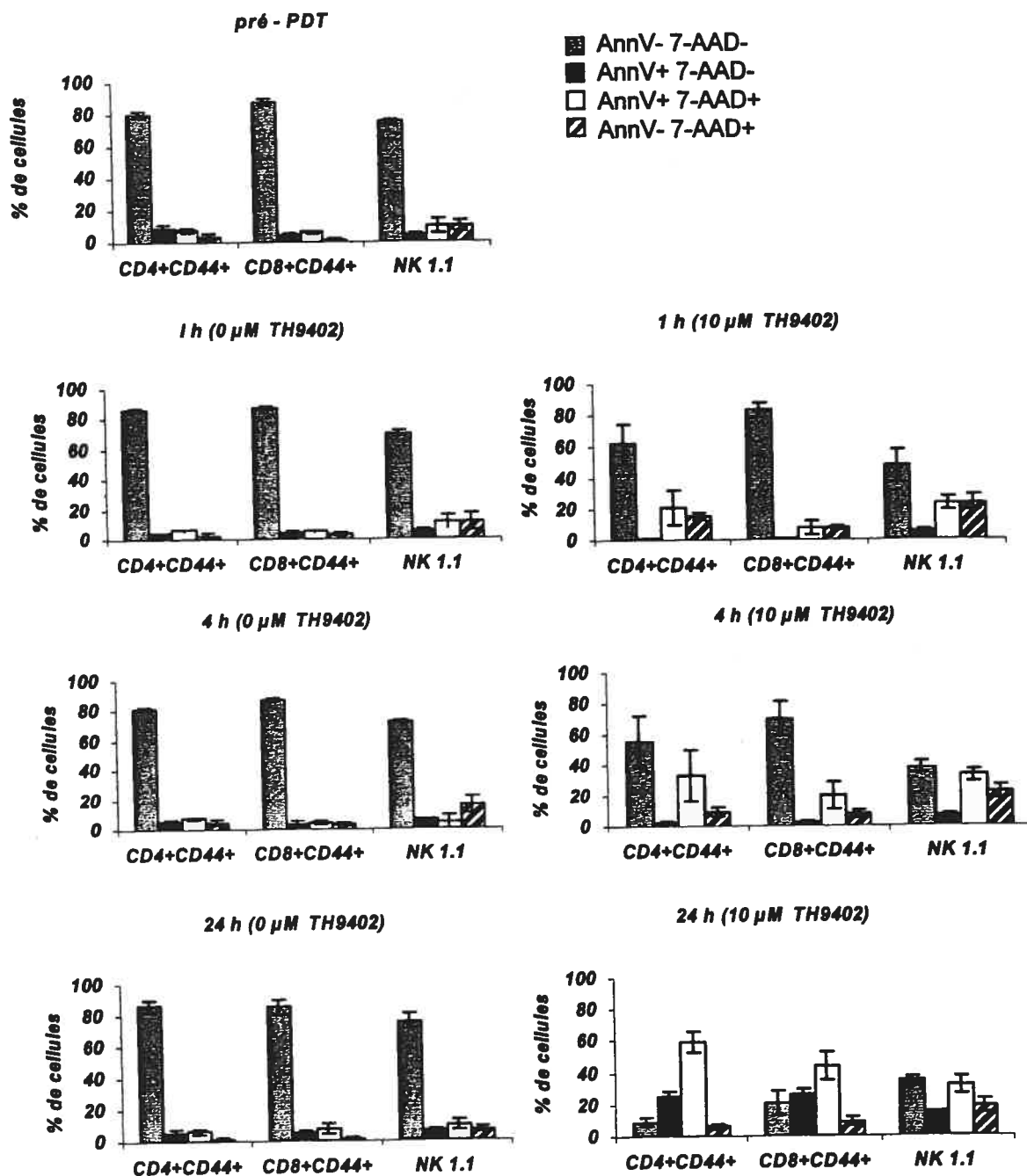
Pour ce qui est des cellules activées à la Con A ( $\text{CD4}^+\text{CD44}^+$ ,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ ,  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+$ ,  $\text{CD8}^+\text{CD25}^+$  et NK), la proportion de cellules mortes à 1h post-PDT est distribuée assez également entre le groupe des cellules à mécanisme inconnu ( $\text{AnnV}^+$  7-AAD $^+$ ) et celui des cellules nécrotiques ( $\text{AnnV}^-$  7-AAD $^+$ ). À 4h post PDT, il y a une augmentation évidente du taux de cellules doublement marquées  $\text{AnnV}^+$  7-AAD $^+$  comparativement aux cellules non traitées. Or en l'absence de cellules  $\text{AnnV}^+$  7-AAD $^-$ , ceci suggère une mort cellulaire par nécrose. Parmi toutes les cellules activées et ayant subi une PDT avec 10  $\mu\text{M}$  de TH9402, on ne peut déceler une entrée tardive en apoptose qu'à 24h post-PDT par rapport au contrôle. (Fig. 6 et 7)

#### 3.2 Mécanismes de mort des splénocytes non activés

Parmi les cellules quiescentes qui sont éliminées par la PDT, les lymphocytes B (B220), les lymphocytes CD4, les lymphocytes CD8 et les cellules NK deviennent doublement marquées par AnnV et 7-AAD comparativement au contrôle. On remarque une augmentation significative de la nécrose pour les cellules NK par rapport au contrôle à

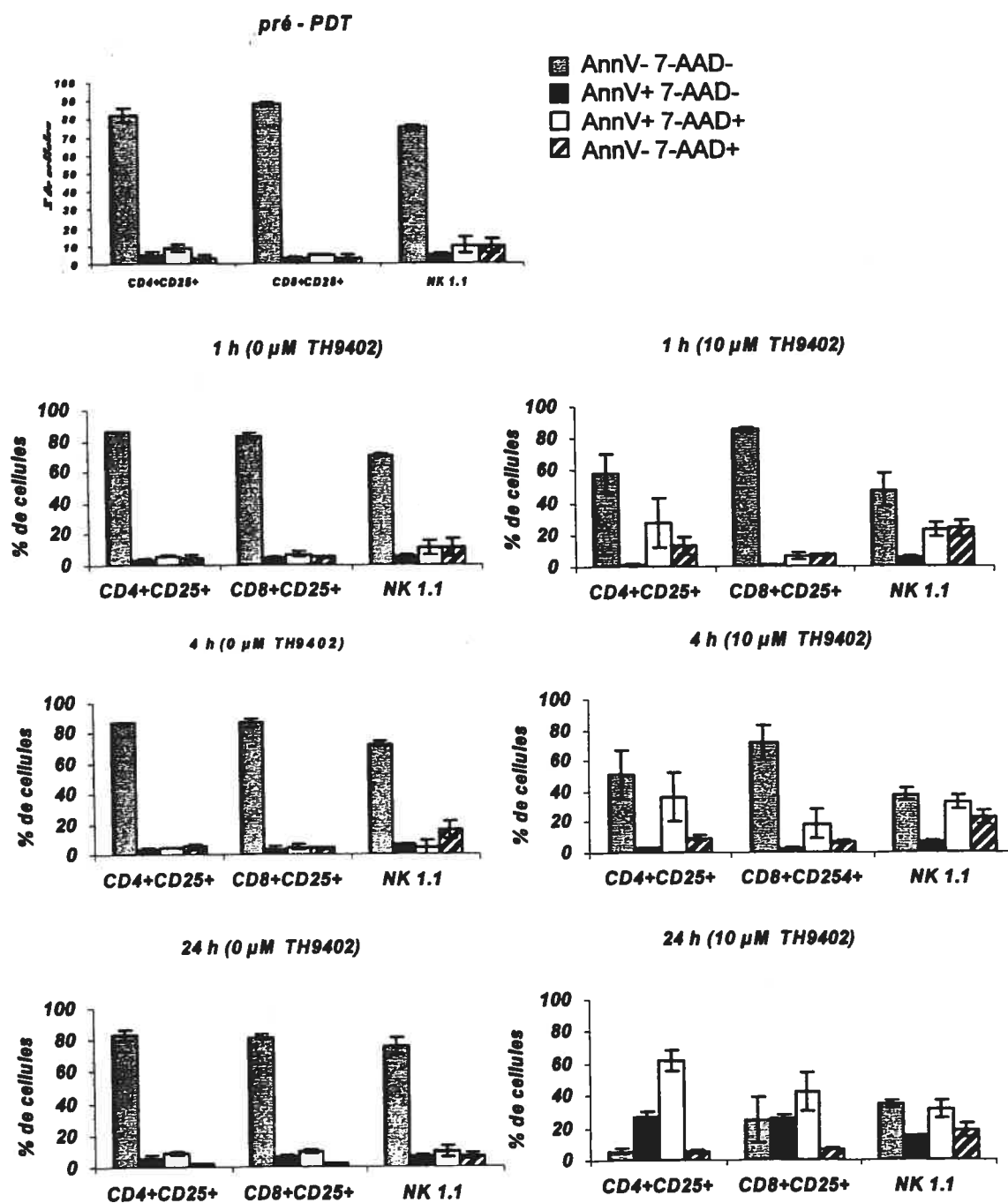
4h et à 24h. Les cellules CD8 mortes démontrent un début de nécrose mais seulement à 24 h. (Fig. 8)

L'apoptose n'est donc pas mise en évidence à aucun moment suivant la PDT dans l'échantillon traité par rapport au contrôle pour toutes les populations lymphocytaires non activées (Fig. 8).

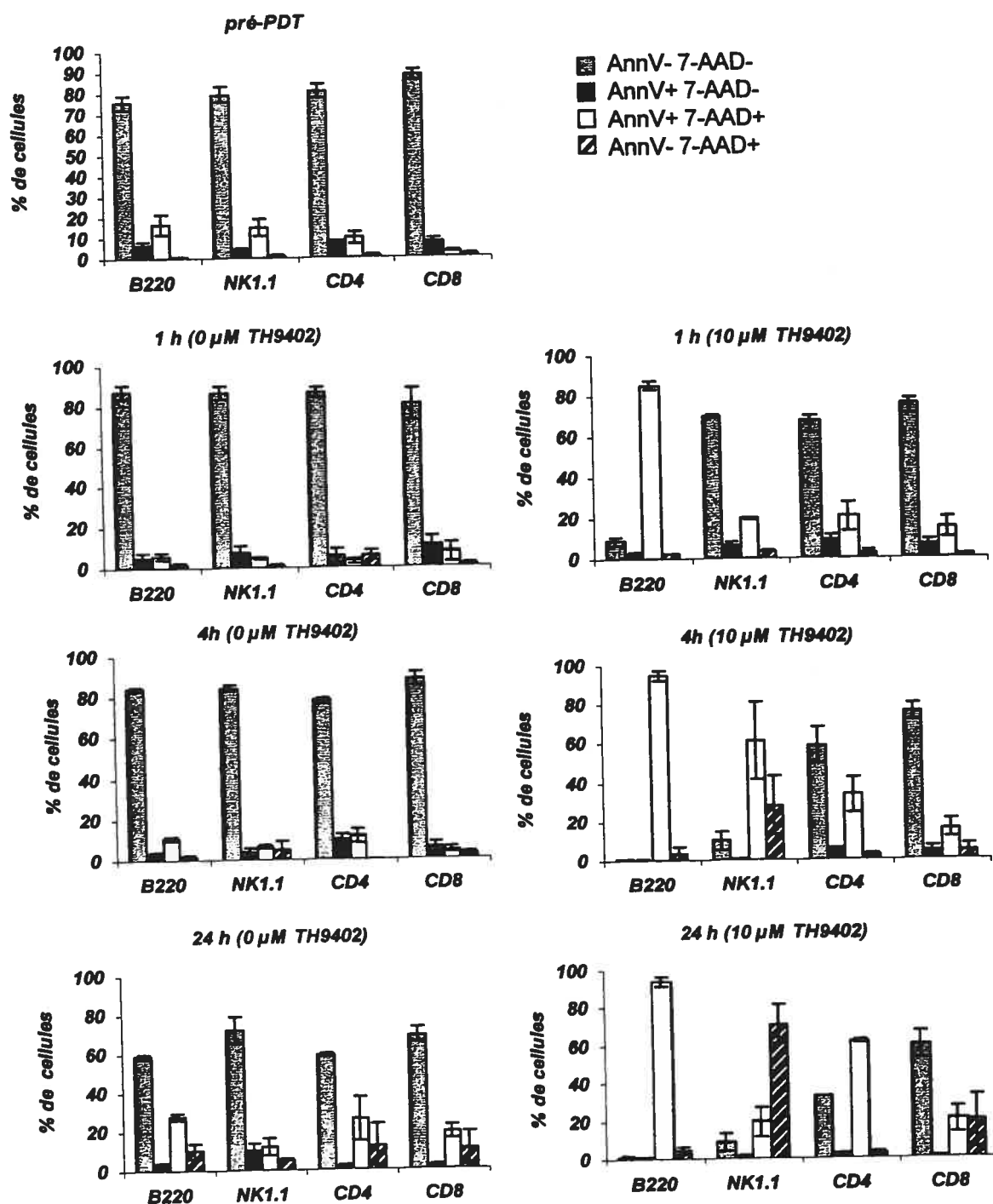


**Figure 6. Mécanisme de la mort des cellules T activées induite par la PDT.** Le pourcentage de cellules CD4+CD44+, CD8+CD44+ et NK1.1+ activées viables (AnnV-7AAD-), apoptotiques (AnnV+7AAD-) et nécrotiques (AnnV-7AAD+) a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4h et 24h.





**Figure 7. Mécanisme de la mort des cellules T activées induite par la PDT.** Le pourcentage de cellules CD4+CD25+, CD8+CD25+ et NK1.1 activées viables (AnnV-7AAD-), apoptotiques (AnnV+7AAD-) et nécrotiques (AnnV-7AAD+) a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4 h et 24h.



**Figure 8. Mécanisme de la mort des splénocytes quiescents induite par la PDT.** Le pourcentage de cellules B, NK, CD4 et CD8 au repos viables (AnnV-7AAD-), apoptotiques (AnnV+7AAD-) et nécrotiques (AnnV-7AAD+) a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1h, 4h et 24h.

#### 4. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)

##### 4.1 Évaluation de la fonction suppressive des cellules T régulatrices

Des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de souris B6 (H-2b) prélevées à partir des splénocytes frais ont été purifiées par des techniques décrites dans la section Matériel et Méthodes. La purification s'effectue en deux étapes successives : la première est une sélection négative des cellules CD4 avec des billes magnétiques qui a favorisé une pureté supérieure à 90 % en cellules CD4<sup>+</sup>. Les cellules CD4<sup>+</sup> ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-CD25 et ont subi un tri cellulaire pour séparer les deux populations CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. La pureté des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> s'est avérée être supérieure à 98 %.

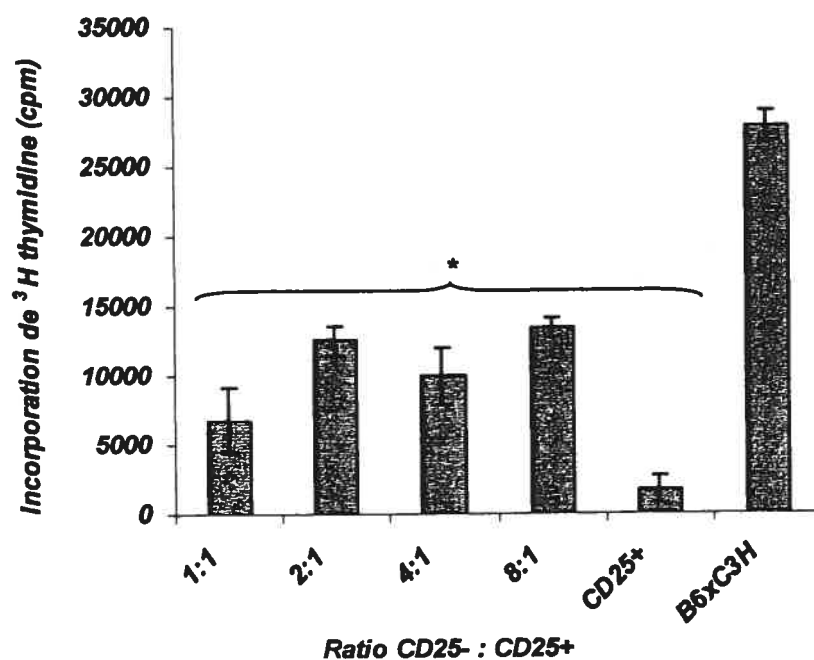
Ainsi, 10<sup>5</sup> cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de souris B6 ont été mises en culture 5 jours avec 10<sup>5</sup> cellules irradiées de rates de souris C3H et utilisées comme cellules stimulatrices. Les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> seules n'ont pas d'effet prolifératif (Fig. 9). Lorsque ces dernières ont été ajoutées en quantité croissante à des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, nous avons observé une inhibition croissante de la prolifération (incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine) de ces dernières par rapport aux cellules non exposées aux cellules Treg. Ceci a confirmé l'effet suppresseur des cellules T régulatrices.

##### 4.2. Impact de la PDT sur les cellules T régulatrices

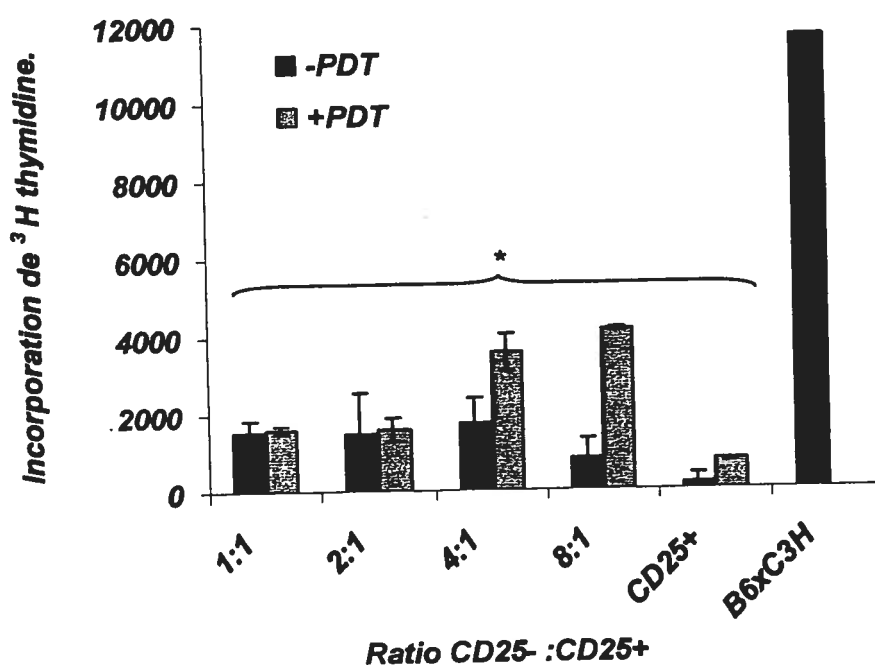
L'effet de la PDT sur les cellules T régulatrices a été évalué en mesurant la capacité de ces cellules traitées à supprimer la prolifération des cellules effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en présence de cellules stimulatrices allogéniques. Dans ce cas, 10<sup>5</sup> cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de souris B6 sont mises en culture avec 10<sup>5</sup> cellules de rates irradiées C3H, avec un nombre variable de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> traitées ou non par la PDT.

L'addition de cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> non traitées a bloqué la prolifération des cellules effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> induite par les cellules stimulatrices allogéniques à tous les ratios CD25<sup>-</sup> : CD25<sup>+</sup> (Fig. 9). Les cellules régulatrices qui ont été traitées à la PDT ont aussi conservé leur capacité d'inhibition de la prolifération des cellules effectrices aux ratios 1 : 1 et 2 : 1. (Fig 10) Notons cependant que cette activité des Treg était diminuée par rapport aux cellules non traitées à la PDT lorsque les ratios de cellules

Treg étaient diminués (4 : 1 et 8 : 1)( $p < 0.05$ ), mais que l'activité Treg persistait néanmoins par rapport au contrôle sans addition de Treg ( $p < 0.05$ ). D'autres membres du laboratoire travaillent présentement à déterminer de façon précise le nombre et la spécificité des cellules Treg qui sont éliminées par la PDT.



**Figure 9. Evaluation de l'effet suppressif des cellules T régulatrices ( $CD4^+CD25^+$ ) de souris B6.** Un nombre fixe de cellules effectrices  $CD4^+CD25^-$  de souris B6 ( $10^5$  cellules) et de cellules stimulatrices allogéniques irradiées de souris C3H déplétées en cellules T ( $10^5$  cellules) ont été mises en culture 5 jours avec un nombre variable de cellules T régulatrices  $CD4^+CD25^+$  afin d'obtenir les ratios  $CD25^-:CD25^+$  indiqués dans le graphique. \* $P \leq 0.05$ , ( $n=2$ ). Expérience représentative de deux.



**Figure 10. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) de souris B6.** Un nombre fixe de cellules effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de souris B6 (10<sup>5</sup> cellules) et de cellules stimulatrices allogéniques irradiées, de souris C3H, déplétées en cellules T (10<sup>5</sup> cellules) ont été mises en culture 5 jours avec un nombre variable de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> traitées ou non par la PDT, afin d'obtenir les ratios CD25<sup>-</sup>:CD25<sup>+</sup> indiqués dans le graphique. \*P ≤ 0.05, (n=2). Expérience représentative de deux.

## 5. Optimisation de la thérapie photodynamique

Pour déterminer si la spécificité de la thérapie photodynamique se reflète dans la capacité des cellules T activées à accumuler préférentiellement de faibles doses du TH9402, nous avons mesuré la cinétique d'incorporation du TH9402 dans les lymphocytes activés et au repos. Les splénocytes totaux étaient activés avec la Con A et les splénocytes au repos étaient incubés avec différentes concentrations de TH9402 (0.5, 1, 2  $\mu$ M) et évalués en mesurant la fluorescence intrinsèque du colorant à différents temps d'incubation. Nous avons ensuite mesuré la cinétique d'incorporation du TH9402 dans les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en les activant dans une réaction mixte lymphocytaire (MLR) et en déterminant la rétention de photosensibilisateur dans ces dernières cellules marquées avec des fluorochromes de couleur différente.

### 5.1. Incorporation préférentielle du TH9402 dans les splénocytes totaux au repos et activés à la Con A.

Les expériences de cinétique d'incorporation du TH9402 montrent que les splénocytes totaux de souris B6 activées pendant 48 h avec la Con A incorporent plus de TH9402 que les splénocytes non activés et ceci à différents temps post-coloration (1, 2, et 3h) et à différentes concentrations du TH9402 (de 0.5 à 2  $\mu$ M) (Fig. 11). Il est intéressant de noter que même s'il n'y a pas de lavage des cellules, ces dernières éliminent graduellement le colorant, que les cellules soient activées ou non. Après 24 heures d'incubation, le TH9402 a atteint des niveaux négligeables de rétention dans les cellules au repos et activées.

Nous avons ensuite voulu déterminer si la rétention préférentielle du TH9402 dans les cellules activées face aux cellules non activées était préservée dans des conditions d'activation cellulaire spécifique à des antigènes du CMH. Nous avons aussi voulu utiliser des conditions de traitement qui permettaient de mesurer dans un même processus d'activation et dans la même culture à la fois les cellules au repos et les cellules activées. A cette fin, nous avons exposé des splénocytes B6 à des cellules stimulatrices allogéniques C3H (CMH différent) et différencié la rétention du colorant dans les cellules activées et non-activées en utilisant un Ac dirigé contre l'antigène d'activation CD44. Nos résultats démontrent que les cellules T activées (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) et (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) incorporent plus de TH9402 que les cellules T au repos (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>)

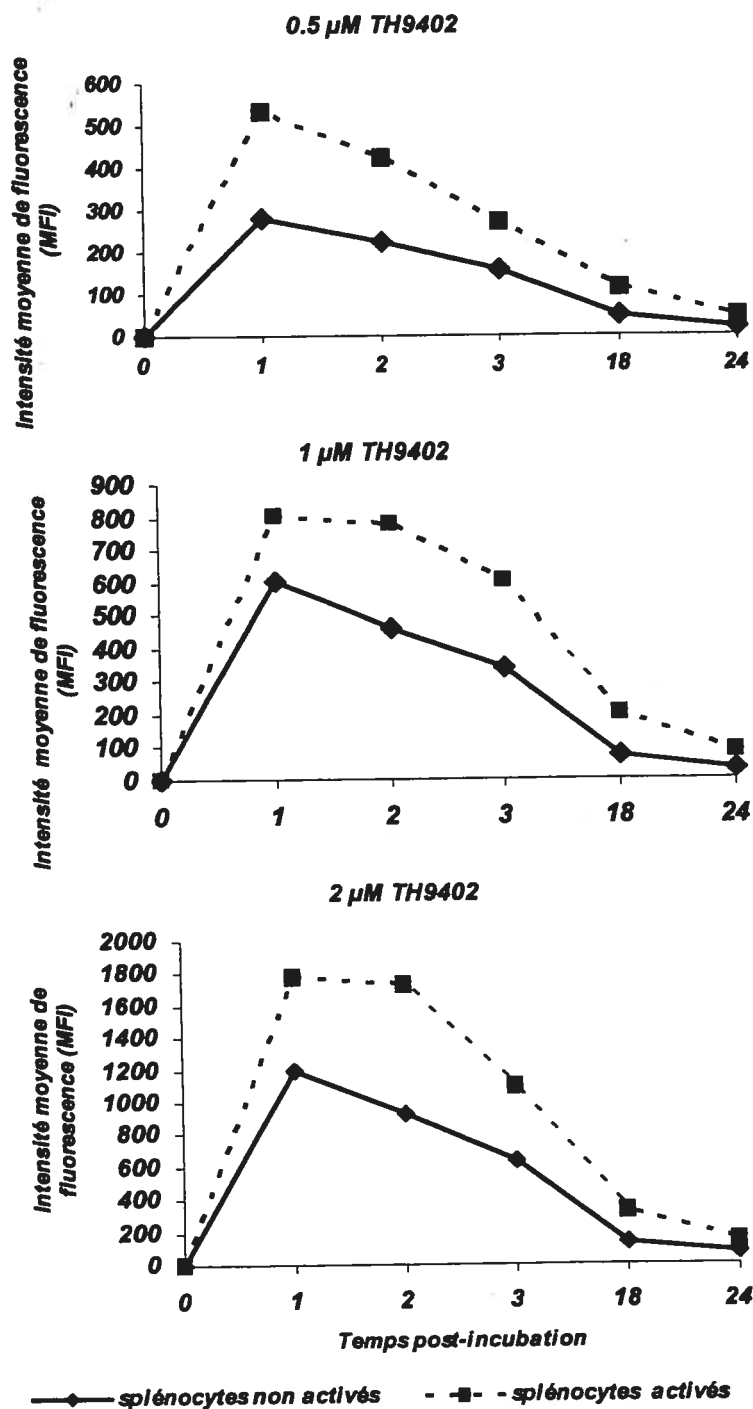
et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>) et ceci à différents temps post-coloration (1, 2, et 3h) et à différentes concentrations du TH9402 (de 0.5 à 2  $\mu$ M) (Fig. 12 et 13). Les cellules T CD44<sup>int</sup> incorporent le TH9402 d'une façon similaire au CD44<sup>lo</sup>. Ces résultats démontrent que la cinétique d'incorporation du TH9402 est différentielle et associée à l'état d'activation des cellules T.

Des travaux effectués dans notre laboratoire indiquent qu'un taux de rétention du TH9402 supérieur à 800 unités de fluorescence (MFI : "mean fluorescence index"), utilisant une calibration avec des billes fluorescentes d'intensité connue, permet une élimination de plus de 90% de ces cellules (D.C. Roy, données non publiées). Dans ce contexte, nos expériences de cinétique suggèrent qu'à la concentration de 1  $\mu$ M, le TH9402 est suffisamment retenu dans les cellules T activées pour induire leur éradication. Il est aussi possible d'identifier des conditions de traitement avec le TH9402 qui dépassent une MFI de 800 pour les cellules activées, mais où la rétention est inférieure à 500 dans les cellules T au repos. Comme un niveau de coloration inférieure à 500 est trop faible pour induire leur élimination, il devrait donc être possible d'utiliser ces conditions pour préserver l'activité préférentielle du photosensibilisateur pour les lymphocytes activés. Pour cette raison nous avons choisi les conditions suivantes pour poursuivre la mise au point du processus de la PDT : concentration du TH9402 de 1  $\mu$ M, 60 minutes de coloration, énergie lumineuse de 5 J/cm<sup>2</sup>, une épaisseur de suspension cellulaire de 1.3 mm et une concentration cellulaire de 1x10<sup>6</sup> cellules/ml.

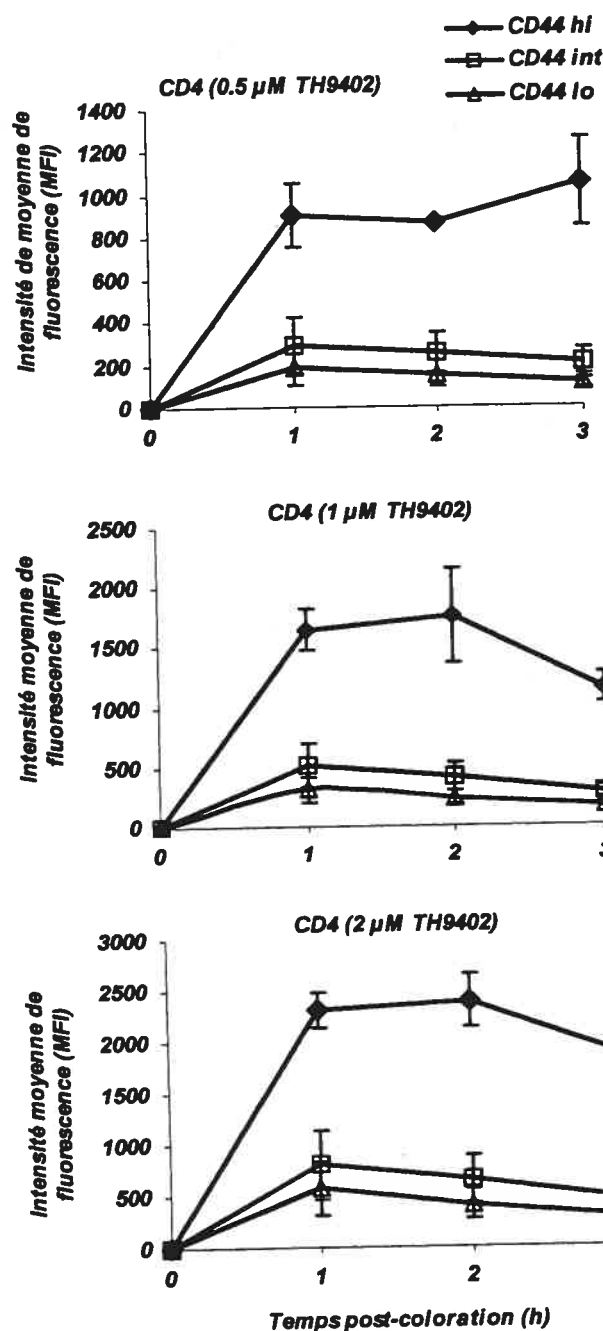
## 5.2. Effet de la PDT sur les cellules T activées en MLR.

Nous avons donc évalué l'effet du traitement des splénocytes activés en MLR à 1  $\mu$ M de TH9402 sans période d'efflux en utilisant une approche photodynamique. Ce traitement démontre élimination de presque la totalité des splénocytes qui incluent les lymphocytes T activées et au repos (Fig. 14). Ces conditions de PDT n'ont donc pas permis de mettre en évidence la sélectivité d'incorporation notée plus haut. D'où l'importance d'évaluer l'effet de doses de TH9402 inférieures à 1  $\mu$ M soit : 0.1, 0.25, et 0.5  $\mu$ M TH9402.

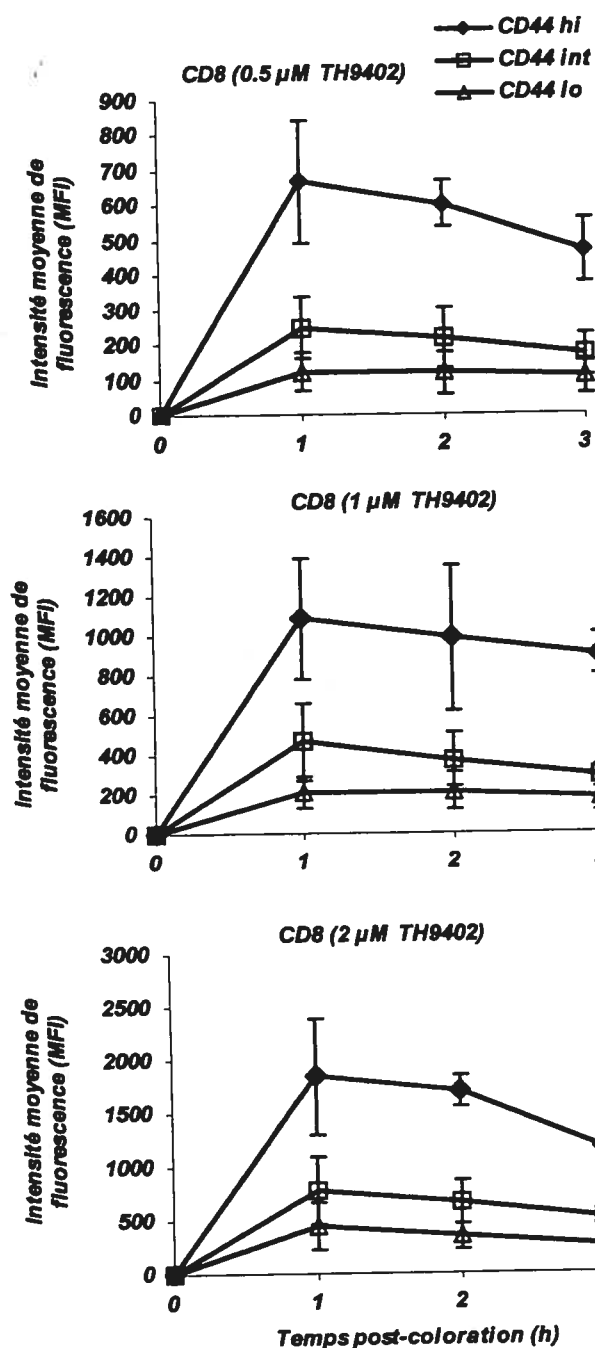




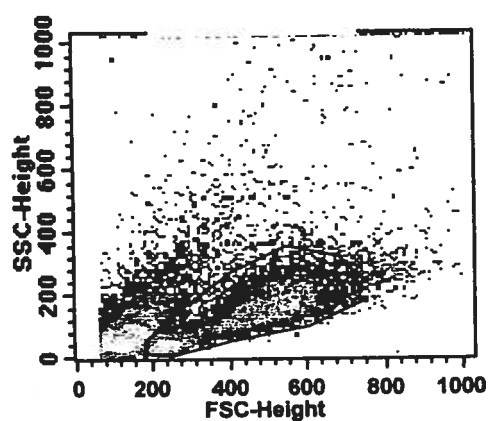
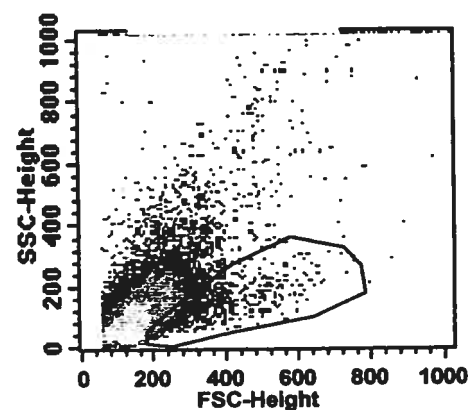
**Figure 11.** Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les splénocytes quiescents et les splénocytes activées à la Con A. Les splénocytes frais de souris B6 ont été mis en culture pendant 48h avec ou sans Con A puis incubées avec 0.5, 1 et 2  $\mu\text{M}$  TH9402. La rétention du TH9402 dans les splénocytes activés et les splénocytes quiescents a été évaluée par cytométrie en flux. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du TH9402 a été déterminée à différents temps d'incubation (1, 2, 3, 18 et 24 h), (n=1).



**Figure 12. Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les lymphocytes T CD4 au repos et activés en MLR.** Les splénocytes de souris B6 ont été activés en MLR contre des cellules stimulatrices allogéniques de souris C3H. Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD44 et incubées avec 0.5, 1 ou 2  $\mu$ M TH9402 pendant différents temps (1, 2, et 3 heures). La rétention du TH9402 dans les CD4 a été évaluée par cytométrie en flux. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du TH9402 a été évaluée dans les CD4 activées (CD44<sup>hi</sup>), les CD4 intermédiaires (CD44<sup>int</sup>) et les CD4 naïves (CD44<sup>lo</sup>), (n=2).



**Figure 13. Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les lymphocytes T CD8 au repos et activés en MLR.** Les splénocytes de souris B6 ont été activés en MLR contre des cellules stimulatrices allogéniques de souris C3H. Les cellules sont ensuite marquées et incubées avec 0.5, 1 ou 2  $\mu$ M TH9402 pendant différents temps (1, 2, et 3 heures). La rétention du TH9402 dans les CD8 a été évaluée par cytométrie en flux. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du TH9402 a été évaluée dans les CD4 activées (CD44<sup>hi</sup>), les CD4 intermédiaires (CD44<sup>int</sup>) et les CD4 naïves (CD44<sup>lo</sup>), (n=2).

**Pré-PDT****Post-PDT**

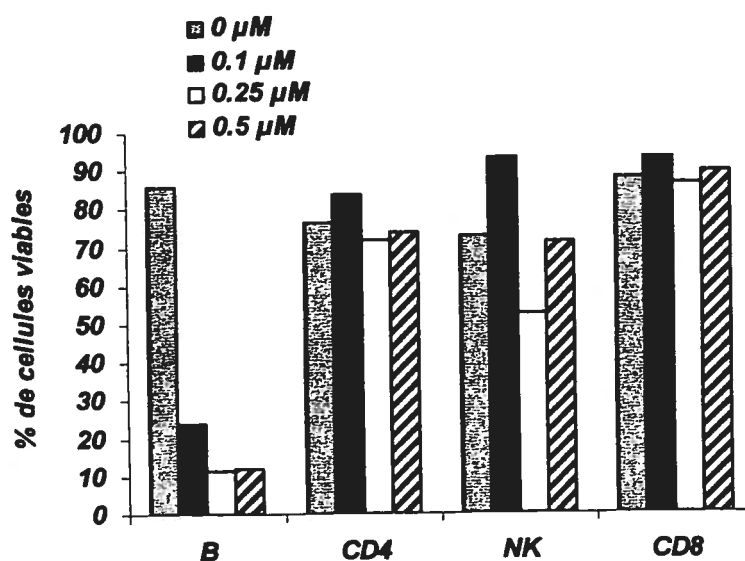
**Figure 14. Analyse de cytométrie en flux des splénocytes après traitement par PDT.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 4 jours en présence de splénocytes de souris C3H irradiés. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 1 $\mu$ M TH9402 / 60 min coloration / 5 J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Les graphiques de densité A et B représentent les cellules pré-PDT et les cellules à 1 h post-PDT, respectivement.

### 5.3. Variation de la concentration du TH9402

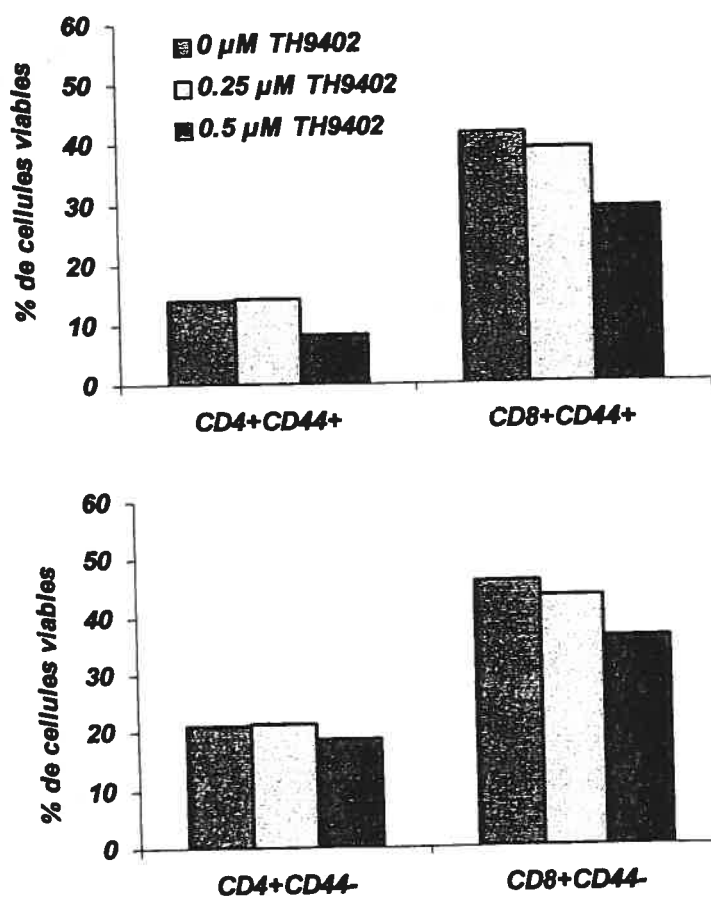
L'application des conditions du traitement: 0.1, 0.25, 0.5  $\mu\text{M}$  / 60 min / 5 J/cm<sup>2</sup> / 1.3mm /  $1 \times 10^6$  cellules/ml sur des splénocytes frais permet même à 0.5  $\mu\text{M}$  de TH9402 de préserver 97, 98 et 100 % des cellules NK, des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et des CD8<sup>+</sup> au repos, respectivement. Par contre, les cellules B sont plus sensibles à la PDT dans ces mêmes conditions du traitement et seulement 14 % des cellules B restent viables (Fig. 15).

L'application de ces mêmes conditions de traitement à des splénocytes activés en MLR montre qu'à 0.5  $\mu\text{M}$  de TH9402, 89 % des cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> et 78 % des CD8<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> (T CD44 au repos) sont préservés à 4 h post-PDT (Fig. 16), mais ces conditions préservent aussi 58 % des cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et 70 % des cellules CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> (T CD44 activées) (Fig. 16). De plus, les cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> ne sont pas éliminés par apoptose (Fig. 17). Donc, ces conditions de traitement préservent la majorité des cellules T au repos, mais ne sont pas adéquates pour éliminer une quantité importante de cellules T activées.

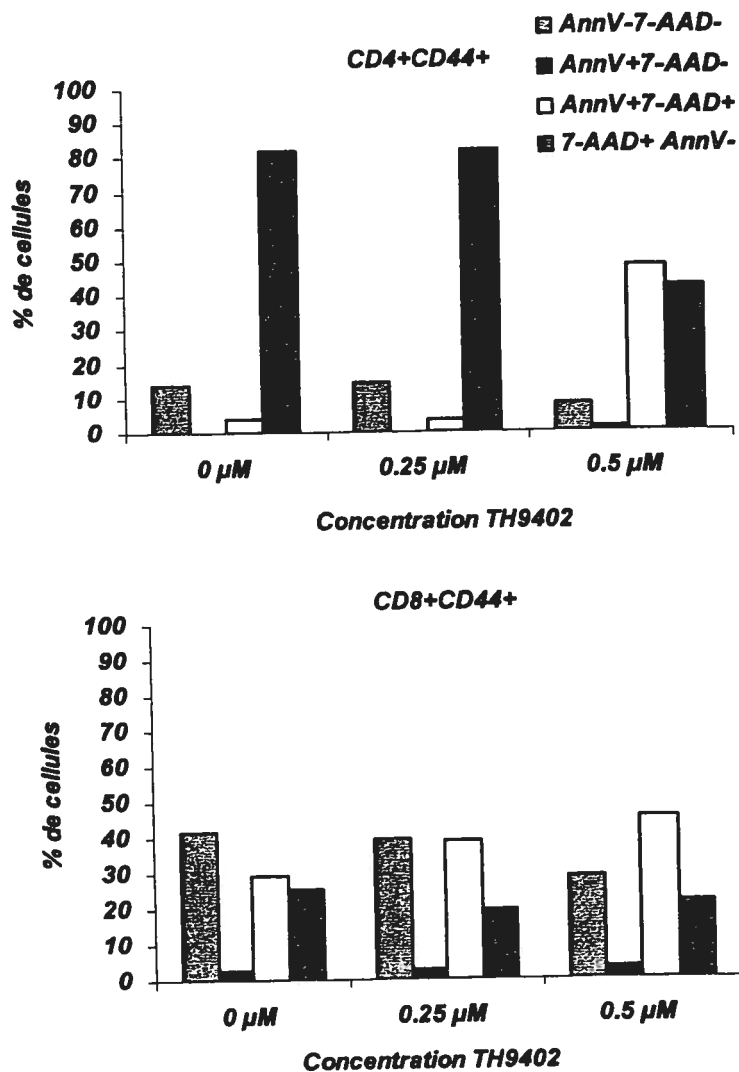
La thérapie photodynamique dépend de plusieurs facteurs tels la concentration de TH9402, la durée de la période d'incubation, l'intensité de l'énergie lumineuse, l'épaisseur des cellules durant l'irradiation ainsi que la concentration cellulaire durant le traitement. Nous avons donc procédé à une série d'expériences dans lesquelles nous avons fait varier ces différents paramètres de PDT afin de tenter d'obtenir une élimination sélective des cellules T activées avec de faibles concentrations de colorant.



**Figure 15. Effet de la PDT sur des splénocytes quiescents utilisant de faibles doses de TH9402.** Des splénocytes frais de souris B6 ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 0.1, 0.25, 0.5  $\mu\text{M}$  TH9402 / 60 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm/ 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le nombre de cellules B, CD4, NK et CD8 viables a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.



**Figure 16. Effet de la PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activées en MLR.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 4 jours en présence de splénocytes irradiés de souris C3H. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0, 0.25, 0.5 µM TH9402 / 60 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules T (CD4 et CD8) qui sont CD44+ et CD44- a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables sont représentées par les cellules AnnV-7AAD-.



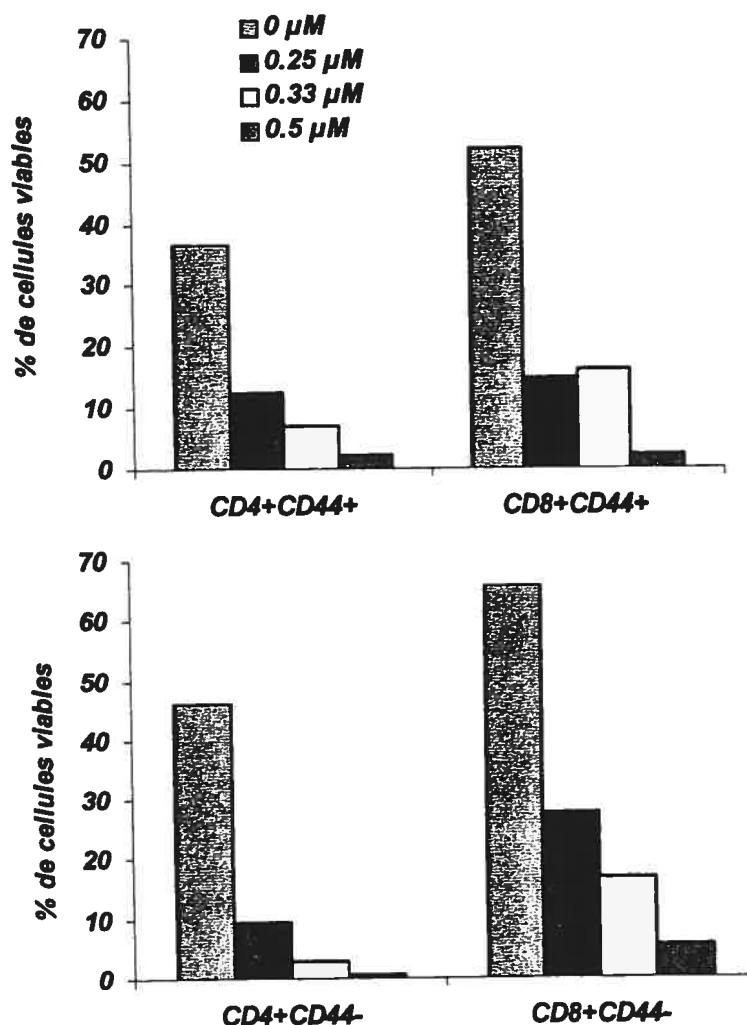
**Figure 17. Mécanisme de la mort induite par la PDT des cellules T CD4 et CD8 activées en MLR.** Des splénocytes de souris B6 activés pendant 4 jours en MLR ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 0, 0.25, 0.5  $\mu$ M TH9402 / 60 min/ 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le pourcentage de cellules CD4+CD44+ et CD8+CD44+ viables (AnnV-7AAD-), apoptotiques (AnnV+7AAD+) et nécrotiques (AnnV+7AAD-) a été évalué à 4 h post-PDT.



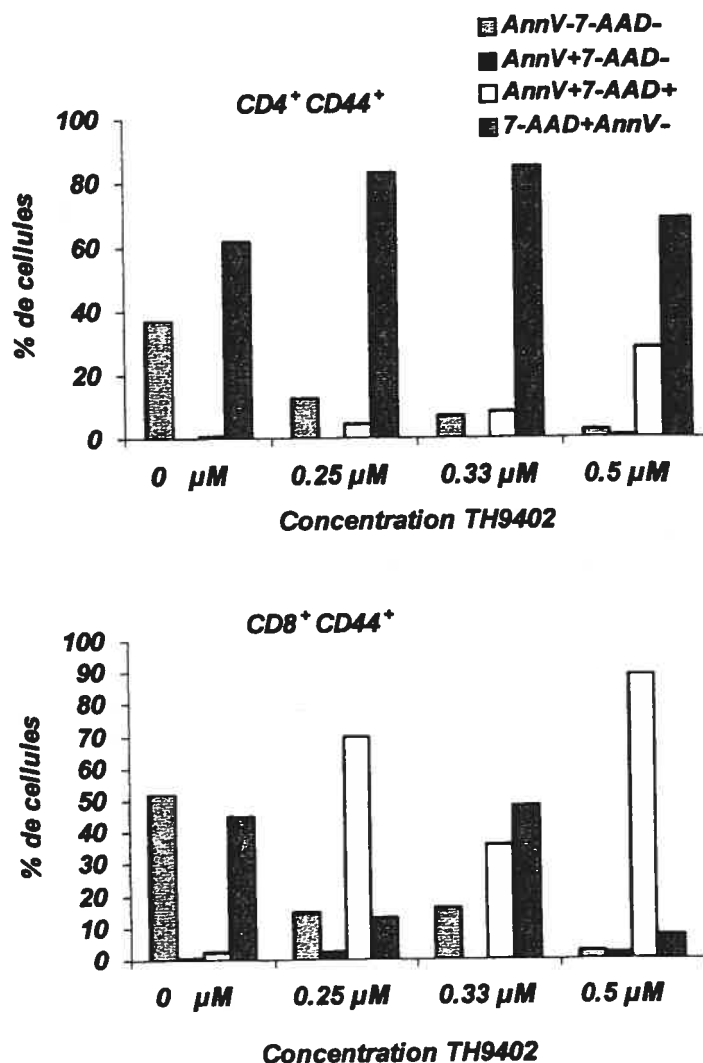
#### 5.4. Variation du temps d'incubation

En augmentant la durée d'incubation et en retardant le moment de l'illumination, nous devrions préserver la cytotoxicité contre les cellules T activées, qui retient plus de TH9402. Cette prolongation de l'incubation entraîne cependant une baisse de la rétention dans les cellules T au repos. Nous avons donc évalué 3 concentrations de TH9402 dans les conditions suivantes : 120 min d'incubation / 5 J/cm<sup>2</sup> d'illumination / 1.3 mm d'épaisseur / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Lorsque des splénocytes activées en MLR sont exposés à ces conditions, nous avons observé une élimination efficace des cellules T CD44<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) et cette élimination augmente en fonction de la concentration du TH9402 (Fig. 18). À 4h post-PDT et à 0.5 µM TH9402, 6.5 % des cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, et 4 % des CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> restent viable. Néanmoins, il persiste une élimination importante des cellules T au repos (Fig. 18).

Les cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> sont principalement éliminées par nécrose à toutes les concentrations de TH9402 car on observe une augmentation des cellules AnnV<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup> avec l'accroissement de la concentration de TH9402 (Fig. 19). Pour les cellules CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, on ne peut pas spécifier le processus de la mort induite par la PDT étant donné que la majorité des cellules mortes sont AnnV<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>, ce qui pourrait signifier soit une apoptose tardive, soit un processus de nécrose (Fig. 19).



**Figure 18. Effet de nouvelles conditions de PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activés en MLR.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 4 jours en présence de splénocytes irradiés de souris C3H. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0, 0.25, 0.33, 0.5 μM TH9402 / 120 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules T (CD4 et CD8) qui sont CD44+ et CD44- a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables sont représentées par les cellules AnnV-7AAD-. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.



**Figure 19. Mécanisme de la mort induite par de nouvelles conditions de PDT des cellules T CD4 et CD8 activées en MLR.** Des splénocytes de souris B6 activés pendant 4 jours en MLR ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 0, 0.25, 0.33, 0.5 μM TH9402 / 120 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le pourcentage de cellules CD4+CD44+ et CD8+CD44+ viables (AnnV-7AAD-), apoptotiques (AnnV+7AAD-) et nécrotiques (AnnV-7AAD+) a été évalué à 4 h post-PDT.

### 5.5. Variation de l'énergie lumineuse

Puisqu'une énergie lumineuse de  $5 \text{ J/cm}^2$  induit une élimination des cellules CD4 activées en impliquant principalement la nécrose, nous avons voulu vérifier si une diminution de l'intensité lumineuse altérerait le mécanisme de la mort induite par la PDT. En effet, d'autres expériences effectuées dans notre laboratoire avaient démontré qu'une intensité plus faible d'illumination pouvait accentuer l'induction d'apoptose aux dépens de la nécrose des cellules cibles.

Les conditions de traitement ont donc été modulées au niveau de l'énergie lumineuse ( $0.5 \mu\text{M}$  TH9402 / 120min d'incubation / illumination de 2, 3 et  $5 \text{ J/cm}^2$  / épaisseur de 1.3 mm /  $1 \times 10^6$  cellules/ml). En traitant ainsi des splénocytes activés avec la Con A, la diminution de l'énergie lumineuse a causé une diminution de l'élimination des cellules T CD44+ ( $\text{CD4}^+\text{CD44}^+$  et  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+$ ). En fait, une intensité lumineuse de  $2 \text{ J/cm}^2$  préservait la grande majorité des cellules T CD44+ (87 % des  $\text{CD4}^+\text{CD44}^+$  et 93 % des  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+$ ). Une intensité lumineuse de  $3 \text{ J/cm}^2$  a éliminé 55 % des  $\text{CD4}^+\text{CD44}^+$  et 37 % des  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+$ , tandis qu'une intensité de  $5 \text{ J/cm}^2$  éliminait la majorité des cellules T CD44+ (80 % des  $\text{CD4}^+\text{CD44}^+$  et 74 % des  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+$ ) (Fig. 20).

À toutes les intensités lumineuses, le taux de cellules apoptotiques ( $\text{AnnV}^+$  7-AAD $^-$ ) est cependant demeuré inaltéré et comparable au contrôle de cellules non traitées (Fig. 21).

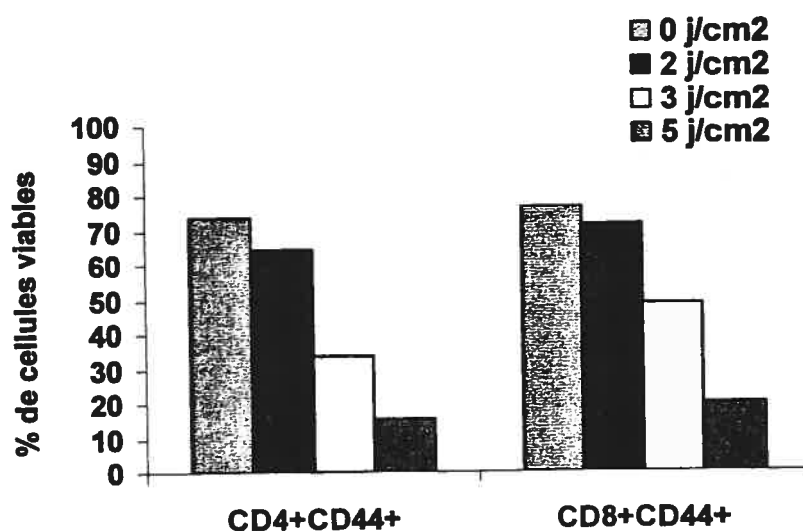
### 5.6. Variation de la concentration cellulaire et de l'épaisseur pendant l'irradiation.

Dans le but de déterminer si le fait d'augmenter l'épaisseur et la concentration des cellules permettait de diminuer l'intensité du traitement et d'éliminer les cellules activées par un mécanisme d'apoptose, les splénocytes de souris B6 activés avec la Con A pendant 48h ont été traités par la PDT dans les conditions suivantes :  $0.5$  et  $1 \mu\text{M}$  / 120 min /  $5 \text{ J/cm}^2$  / 1 cm /  $10 \times 10^6$  cellules/ml.

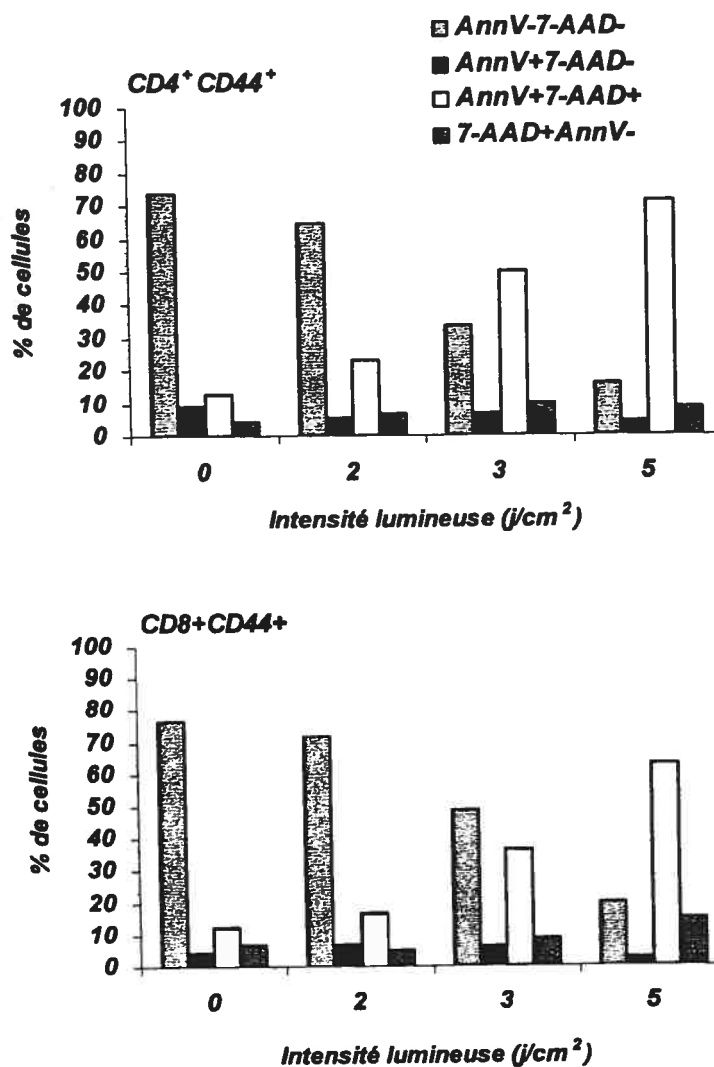
À  $0.5$  et  $1 \mu\text{M}$  de TH9402, en augmentant l'épaisseur et la concentration cellulaire durant le traitement, l'effet de la PDT sur l'élimination des cellules T activées est diminué. En effet, à la concentration de  $1 \mu\text{M}$  de TH9402, 13 % des  $\text{CD4}^+\text{CD44}^+$  et 50 % des  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+$  sont préservés (Fig. 22). De plus, à 4 heures après le traitement,

les cellules T CD44<sup>+</sup> ne sont plus viables, mais le mécanisme de mort cellulaire n'a pu être clairement identifié. En effet, le phénomène observé pourrait être celui d'une nécrose avec altération membranaire ressemblant à l'apoptose, ou encore une apoptose tardive (Fig. 23). Finalement, lors d'un traitement avec une concentration cellulaire à  $20 \times 10^6$  cellules/ml, les cellules activées démontraient peu de sensibilité au traitement (Fig. 24).

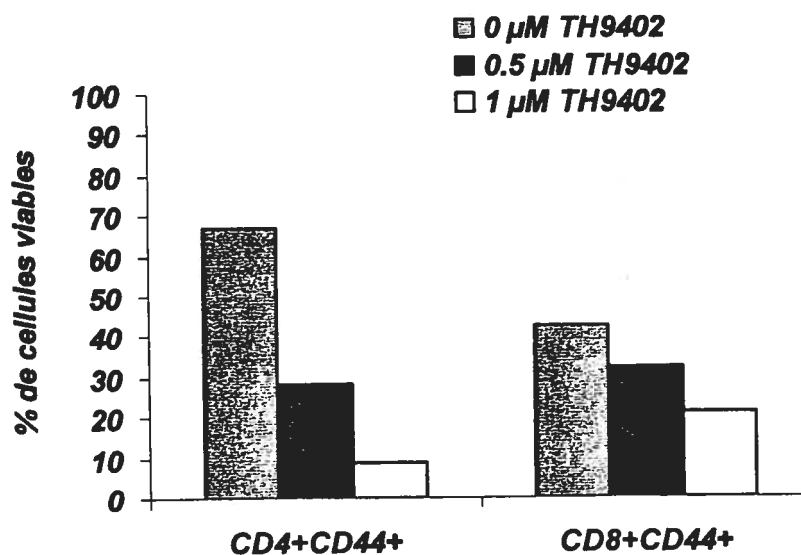
Dans toutes les conditions du traitement utilisant de faibles doses de TH9402, et sans la période d'efflux, nous avons surtout observé une élimination des cellules T autant activées qu'au repos. Comme nous avons tenté d'identifier des conditions permettant une élimination sélective des cellules activées, nous n'avons pas réussi à atteindre cet objectif. La période d'efflux semble indispensable pour induire une déplétion préférentielle des lymphocytes T activés. De plus, sans la période d'efflux précédant le traitement, nous n'avons pu déceler un effet important de mort cellulaire par apoptose (Ann<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup>) dans les cellules T activées.



**Figure 20. Effet de la PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 48 h en présence de Con A et de l'IL-2. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0.5  $\mu$ M TH9402 / 120 min / 2, 3, 5 J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm /  $1 \times 10^6$  cellules/ml. La viabilité des cellules T CD4+CD44+ et CD8+CD44+ a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables ont été les cellules AnnV-7AAD<sup>-</sup>. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.

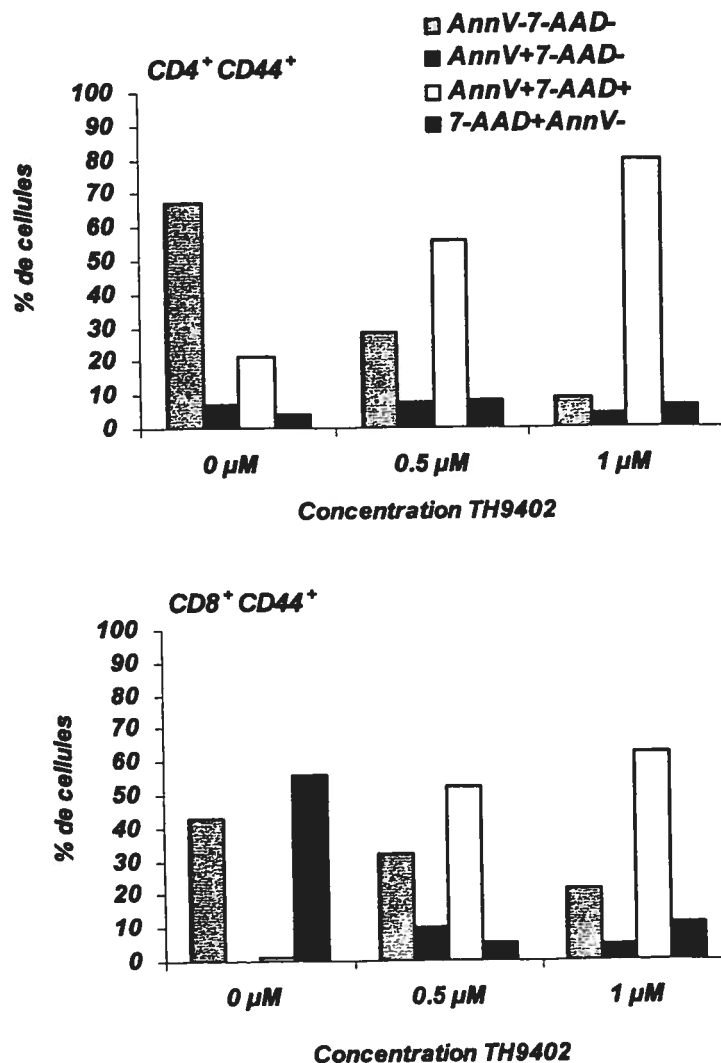


**Figure 21. Mécanisme de la mort induite par la PDT des cellules T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.** Des splénocytes de souris B6 activées avec la Con A ont été traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0.5  $\mu$ M TH9402 / 120 min / 2, 3, 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> viables (AnnV-7AAD<sup>-</sup>), apoptotiques (AnnV+7AAD<sup>-</sup>) et nécrotiques (AnnV-7AAD<sup>+</sup>) a été évalué à 4 h post-PDT.

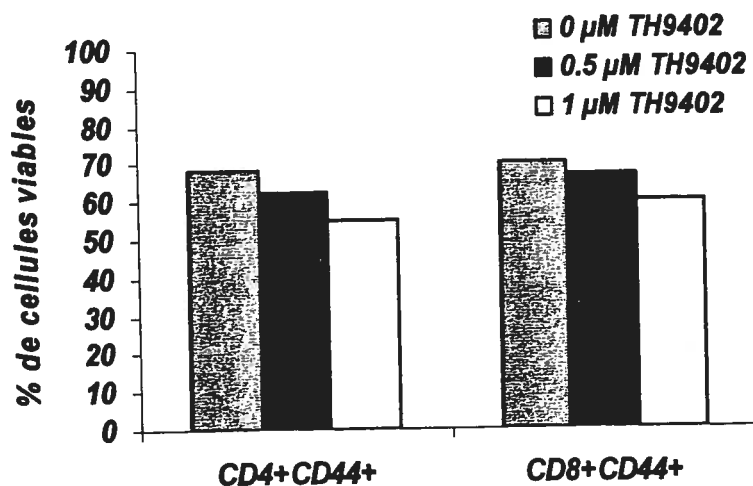


**Figure 22. Effet de nouvelles conditions de PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.** Des splénocytes de souris B6 ont été activées pendant 48 h avec la Con A en présence de l'IL-2. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0.5, 1 μM TH9402 / 120 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1 cm / 10x10<sup>6</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables sont représentées par les cellules AnnV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.





**Figure 23. Mécanisme de la mort induite par de nouvelles conditions de PDT des cellules T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.** Mécanisme de la mort des cellules T activées induite par la PDT. Des splénocytes de souris B6 activées avec la Con A ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 0.5, 1  $\mu$ M TH9402 / 120 min / 2, 3, 5J/cm<sup>2</sup> / 1 cm / 10x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> viables (AnnV-7AAD<sup>-</sup>), apoptotiques (AnnV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) et nécrotiques (AnnV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) ont été évalués à 4 h post-PDT.



**Figure 24. Effet de nouvelles conditions de PDT sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activées à la Con A et IL-2.** Des splénocytes de souris B6 ont été activées pendant 48 h avec la Con A en présence de l'IL-2. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0.5, 1 µM TH9402 / 120 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1 cm / 20x10<sup>6</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules T CD4+CD44<sup>+</sup> et CD8+CD44<sup>+</sup> a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables sont représentées par les cellules AnnV-7AAD<sup>-</sup>. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.

## SOMMAIRE DES RÉSULTATS

Population cellulaire	% d'élimination			AnnV <sup>+</sup> 7-AAD <sup>-</sup> ( Apoptose )			AnnV <sup>-</sup> 7-AAD <sup>+</sup> ( Apoptose tardive ou nécrose )			AnnV <sup>-</sup> 7-AAD <sup>+</sup> ( Nécrose seulement )		
	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	38.2	34.6	97	1.11	2.57	25.53	21.33	33.13	59.19	15.21	9.06	6.32
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	37	32.2	97.4	1.25	3.03	26.66	27.47	36.5	62	13.2	9.62	5.36
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	47.6	27.6	96.3	1.17	2.7	26.2	7.83	19.78	44.29	7.86	7.33	9.19
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	57.7	26.3	98.2	0.87	2.77	25.79	7	18.35	42.28	6.34	6.87	7.03
CD4 au repos	25	50	60	9.46	5.72	2.42	20.6	33.33	61.65	2.56	2.41	2.85
CD8 au repos	2	20	33	7.01	4.24	0.97	14.83	15.86	20.29	1.35	4.32	19.22
NK activés	78	70	90.3	5.51	6.67	15.07	23.43	33.26	18.33	23.79	22.35	31.61
NK au repos	37	89	88.5	6.81	0.8	0.97	19.6	61.5	19.25	3.53	27.78	70.81
B	93.5	99.5	99	2.83	0.41	0.52	85.3	95.1	93.57	2.67	3.59	4.73

**Tableau 1. Effet de la PDT sur des splénocytes activés et quiescents.** Des splénocytes de souris B6 Fraîchement prélevés ou activés pendant 48 h avec la Con A ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 10µM TH9402 / 40 min / 50 min / 50 min / 5j/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le pourcentage de cellules CD4, CD8, NK et B viables (AnnV<sup>-</sup> 7-AAD<sup>-</sup>), apoptotiques (AnnV<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup>) et nécrotiques (AnnV<sup>-</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à différents temps après traitement, soit 1 h, 4 h et 24 h. Les deux marqueurs d'activations CD44 et CD25 ont été étudiés pour les cellules T activés. Des cellules contrôles également activés avec la Con A, ou fraîches ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.

<i>Population cellulaire</i>	<i>Prolifération (CPM)</i>
B6/C3H	27884.3 (+++++)
CD25 <sup>+</sup>	1706 (-)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 1:1	6766.5 (+)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 2:1	12514.5 (++)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 4:1	9955.5 (++)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 8:1	13454 (++)

**Tableau II. Evaluation de l'effet suppressif des cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) de souris B6.** Un nombre fixe de cellules effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de souris B6 (10<sup>5</sup> cellules) et de cellules stimulatrices allogéniques irradiées de souris C3H déplétées en cellules T (10<sup>5</sup> cellules) ont été mises en culture 5 jours avec un nombre variable de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> afin d'obtenir les ratios CD25<sup>-</sup>:CD25<sup>+</sup> indiqués dans le tableau ci dessus. Lorsque ces dernières ont été ajoutées en quantité croissante à des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, nous avons observé une inhibition croissante de la prolifération (incorporation de 3H-thymidine) de ces dernières par rapport aux cellules non exposées aux cellules Treg.

	<i>-PDT</i>	<i>+PDT</i>
<i>Population cellulaire</i>	<i>Prolifération (CPM)</i>	<i>Prolifération (CPM)</i>
B6/C3H	11662 (++++++)	
CD25 <sup>+</sup>	153.5 (-)	752 (-)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 1:1	1520.5 (+)	1598 (+)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 2:1	1510 (+)	1598.5 (+)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 4:1	1755 (+)	3566.5 (++)
Ratio CD25 <sup>-</sup> :CD25 <sup>+</sup> 8:1	814 (+)	415.3 (++)

**Tableau III. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) de souris B6.** Un nombre fixe de cellules effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de souris B6 (10<sup>5</sup> cellules) et de cellules stimulatrices allogéniques irradiées, de souris C3H, déplétées en cellules T (10<sup>5</sup> cellules) ont été mises en culture 5 jours avec un nombre variable de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> traitées ou non par la PDT, afin d'obtenir les ratios CD25<sup>-</sup>:CD25<sup>+</sup> indiqués dans le tableau ci dessus. L'addition de cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> non traitées a bloqué la prolifération des cellules effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> induite par les cellules stimulatrices allogéniques à tous les ratios CD25<sup>-</sup> : CD25<sup>+</sup> (Fig. 9). Les cellules régulatrices qui ont été traitées à la PDT ont bloqué aussi la prolifération des cellules effectrices aux ratios 1 : 1 et 2 : 1.

Population cellulaire	Concentration du TH 9402	MFI		
		1 h	2 h	3 h
splénocytes activés	0.5 $\mu$ M	531.86	423.16	272.55
	1 $\mu$ M	802.44	776.82	603.6
splénocytes non activés	0.5 $\mu$ M	279.28	224.37	154.38
	1 $\mu$ M	601.82	459.64	336.48
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup>	0.5 $\mu$ M	901.0	867.8	1049.5
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>int</sup>		290.4	251.7	203.6
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>lo</sup>		190.6	153.6	115.9
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup>	1 $\mu$ M	1643.1	1755.4	1148.6
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>int</sup>		516.3	417.8	280.7
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>lo</sup>		309.8	238.3	171.3
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup>	0.5 $\mu$ M	669.4	602.3	471.4
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>int</sup>		247.3	217.9	169.4
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>lo</sup>		122.7	120.1	107.2
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup>	1 $\mu$ M	1087.5	988.3	901.0
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>int</sup>		465.4	372.6	286.5
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>lo</sup>		213.0	211.7	176.4

**Tableau IV. Cinétique d'incorporation du TH9402 dans les lymphocytes T CD4 et CD8 au repos et activés en MLR.** Les splénocytes de souris B6 ont été activés en MLR contre des cellules stimulatrices allogéniques de souris C3H. Les cellules sont ensuite marquées et incubées avec 0.5, 1 ou 2  $\mu$ M TH9402 pendant différents temps (1, 2, et 3 heures). La rétention du TH9402 dans les CD4 et CD8 a été évaluée par cytométrie en flux. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du TH9402 a été évaluée dans les CD4 et CD8 activées (CD44<sup>hi</sup>), les CD4 et CD8 intermédiaires (CD44<sup>int</sup>), les CD4 et CD8 naïves (CD44<sup>lo</sup>). Les cellules T activées (CD4+CD44<sup>hi</sup>) et (CD8+CD44<sup>hi</sup>) incorporent plus de TH9402 que les cellules T au repos (CD4+CD44<sup>lo</sup>) et CD8+CD44<sup>lo</sup>) et ceci à différents temps post-coloration (1, 2, et 3h) et à différentes concentrations du TH9402 (de 0.5 à 1  $\mu$ M).

	<b>Population cellulaire</b>	<b>Concentration du TH 9402</b>	<b>% de préservation</b>
<b>Splénocytes frais</b>	<b>B au repos</b>	<b>0.5 <math>\mu</math>M</b>	<b>14</b>
	<b>NK au repos</b>		<b>97</b>
	<b>CD4 au repos</b>		<b>98</b>
	<b>CD8 au repos</b>		<b>1</b>
<b>Splénocytes activés MLR</b>	<b>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup></b>	<b>0.5 <math>\mu</math>M</b>	<b>58</b>
	<b>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup></b>		<b>70</b>
	<b>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup></b>	<b>0.5 <math>\mu</math>M</b>	<b>89</b>
	<b>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup></b>		<b>78</b>

**Tableau V. Variation de la concentration du TH9402.** Des splénocytes frais de souris B6 et des splénocytes activés pendant 4 jours en présence de splénocytes irradiés de souris C3H ont été traités à la PDT dans les conditions suivantes : 0.1, 0.25, 0.5  $\mu$ M TH9402 / 60 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm/ 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le nombre de cellules B, CD4, NK, CD8 et T CD44 viables a été évalué par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.

Le traitement des splénocytes activés en MLR à 1 $\mu$ M de TH9402 sans période d'efflux a permis l'élimination de presque la totalité des splénocytes qui incluent les lymphocytes T activées et au repos. L'application de faibles doses de TH9402 (0.1, 0.25, 0.5  $\mu$ M) sur des splénocytes activées en MLR montre que même à 0.5  $\mu$ M de TH9402, la majorité des cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et des cellules CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> est encore préservée. Ces conditions de traitement qui préservent la majorité des cellules T au repos sont pas adéquates pour éliminer une quantité importante de cellules T activées.

<i>Population cellulaire</i>	<i>Concentration du TH9402</i>	<i>% de préservation Incubation: 60 min</i>	<i>% de préservation Incubation: 120 min</i>	<i>Mécanisme Incubation:120 min</i>
<i>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup></i>	<i>0.5 <math>\mu</math>M</i>	<i>58</i>	<i>6</i>	<i>69 % nécrose</i>
<i>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup></i>		<i>70</i>	<i>4</i>	
<i>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup></i>	<i>0.5 <math>\mu</math>M</i>	<i>89</i>	<i>1.7</i>	
<i>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup></i>		<i>78</i>	<i>8.3</i>	

**Tableau VI. Variation du temps d'incubation.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 4 jours en présence de splénocytes irradiés de souris C3H. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0, 0.25, 0.33, 0.5  $\mu$ M TH9402 / 60, 120 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules T (CD4 et CD8) qui sont CD44<sup>+</sup> et CD44<sup>-</sup> a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables sont représentées par les cellules AnnV<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup>. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.

Lorsque les splénocytes activés en MLR sont exposés à ces conditions (0.5  $\mu$ M et 120 min incubation), nous avons observés une élimination efficace des cellules T CD44<sup>+</sup> (CD4 et CD8). Néanmoins, il persiste une élimination importante des cellules T au repos (CD44<sup>-</sup>). Les cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> sont principalement éliminées par nécrose.

Population cellulaire	Concentration du TH9402	% de préservation		
		2 j/cm <sup>2</sup>	3 j/cm <sup>2</sup>	5 j/cm <sup>2</sup>
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	0.5 $\mu$ M	87	45	20
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>		93	63	26

**Tableau VII. Variation de l'énergie lumineuse.** Des splénocytes de souris B6 ont été activés pendant 48 h en présence de Con A et de l'IL-2. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0.5  $\mu$ M TH9402 / 120 min / 2, 3, 5J/cm<sup>2</sup> / 1.3 mm / 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables ont été les cellules AnnV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.

Une diminution de l'énergie lumineuse a causé une diminution de l'élimination des cellules TCD44<sup>+</sup>. À toutes les intensités lumineuses, le taux de cellules apoptotiques est demeuré inaltéré et comparable au contrôle de cellules non traitées

Population cellulaire	Concentration du TH 9402	% de préservation
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	1 $\mu$ M	13
CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>		50

**Tableau VIII. Variation de la concentration cellulaire et de l'épaisseur pendant l'irradiation.** Des splénocytes de souris B6 ont été activées pendant 48 h avec la Con A en présence de l'IL-2. Les cellules ont été ensuite traitées à la PDT dans les conditions suivantes : 0.5, 1  $\mu$ M TH9402 / 120 min / 5J/cm<sup>2</sup> / 1 cm / 10x10<sup>6</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> a été évaluée par un marquage AnnV et 7-AAD et ceci à 4 h après le traitement, les cellules viables sont représentées par les cellules AnnV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>. Des cellules contrôles ont subi le même traitement mais sans être exposées au TH9402 et à la lumière.

En augmentant l'épaisseur et la concentration cellulaire pendant l'irradiation l'effet de la PDT sur les cellules T activées est diminué, même en augmentant la concentration du TH9402 jusqu' à 1uM.



## Quatrième partie

### **DISCUSSION**

<i>Population cellulaire</i>	<i>PDT</i>	
	<i>Élimination</i>	<i>Mécanisme</i>
<i>CD4 activés</i>	+++++	<i>Nécrose +Apoptose</i>
<i>CD4 au repos</i>	++	<i>Nécrose</i>
<i>CD8 activés</i>	+++++	<i>Nécrose +Apoptose</i>
<i>CD8 au repos</i>	+	<i>Nécrose</i>
<i>NK activés</i>	+++	<i>Nécrose +Apoptose</i>
<i>NK au repos</i>	+++	<i>Nécrose</i>
<i>B</i>	+++++	<i>Nécrose</i>
<i>Cellules T régulatrices</i>	+	-

**Tableau IX. Résumé de l'effet de la PDT sur des splénocytes activés et quiescents: élimination et mécanisme.** La thérapie photodynamique présente un profil d'action très intéressant pour le traitement des maladies auto-immunes et de la GVH. En effet, elle élimine de façon préférentielle à la fois les lymphocytes T activés et les lymphocytes B. Or nous savons qu'une cytotoxicité non seulement à médiation cellulaire, mais aussi humorale, est impliquée dans la physiopathologie des maladies auto-immunes et de la GVH. De plus, le fait que le traitement actuel épargne à la fois les lymphocytes T au repos et les T régulateurs, représente une situation quasi idéale qui devrait permettre d'être actif contre les cellules à l'origine de la maladie tout en préservant une activité immunitaire anti-infectieuse et anti-néoplasique.

## **Discussion**

Malgré le grand nombre de stratégies appliquées, la déplétion des cellules T représente la prophylaxie de choix pour prévenir la GVHD. Elle est cependant accompagnée d'effets secondaires souvent mortels tels que l'augmentation de l'incidence de rejet, la rechute leucémique, l'augmentation des infections, la diminution de l'effet GVL ("Graft *versus* Leukemia") et le retard de la reconstitution immunitaire. Une stratégie idéale devrait donc permettre une élimination sélective des cellules T réactives contre l'hôte tout en préservant les cellules T d'autres spécificités antigéniques.

La thérapie photodynamique est une modalité de traitement largement expérimentale. Elle a montré son efficacité dans le traitement des maladies néoplasiques et non néoplasiques. Elle est basée sur la capacité d'un agent photosensible à être activé par la lumière à une longueur d'onde appropriée et de produire des singlets d'oxygène et de radicaux libres. Ceux-ci induisent la mort des cellules en provoquant des dommages oxydatifs.

Les travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que la PDT avec le TH9402 est particulièrement active contre les cellules T activées, elle exerce moins d'effet sur les cellules T au repos et préserve les lymphocytes T régulateurs (voir tableau IX). Elle pourrait donc être une stratégie attrayante pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) qui, malgré les stratégies de prévention appliquées, reste la cause majeure de mortalité survenant après une greffe de moelle osseuse.

### **1. Pertinence du projet**

Dans le cadre du traitement de la GVHD, il est extrêmement important d'éliminer sélectivement la population de cellules T du greffon capable d'engendrer une réponse immunitaire contre l'hôte, donc d'initier la GVHD, tout en préservant les cellules T responsables de l'immunité anti-tumorale et anti-infectieuse.

Les travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire par Guimond *et al* montrent que la PDT est particulièrement active contre les cellules T humaines activées.<sup>73</sup> Cependant, elle pourrait aussi exercer un effet non spécifique sur les autres populations cellulaires. Puisque nous ne pouvons restreindre l'effet de la PDT aux cellules T activées, nous

avons voulu déterminer son impact sur les autres populations lymphocytaires: les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK quiescents ainsi que les cellules T régulatrices. Nous avons analysé son effet sur les cellules T murines activées pour plusieurs raisons. D'abord, Sidi Boumedine *et al* ont démontré que ce processus de PDT permettrait de prévenir la GVDH dans un modèle de souris entièrement incompatible au niveau du CMH.<sup>115</sup> Cependant, l'effet de la PDT sur les différentes populations cellulaires n'avait pas été déterminée. De plus, l'utilisation d'un modèle murin sera très utile pour déterminer l'effet de l'élimination de populations cellulaires définies par la PDT. Enfin, ce modèle permettra de mesurer l'impact des mécanismes de mort cellulaire induite par la PDT.

Le fait d'étudier l'impact de la thérapie photodynamique sur toutes les populations lymphoïdes, ainsi que le mécanisme de la mort induite par la PDT, permet d'une part d'adapter les conditions de la PDT afin de conserver les cellules T quiescentes, et d'autre part de mieux comprendre l'effet immunomodulateur *in vivo* visé dans le traitement de la GVHD.

## **2. Discussion des résultats**

### **2.1. Élimination des cellules T activées par la PDT**

L'effet de la PDT est basé non seulement sur la génération de radicaux libres et de singlets d'oxygènes mais aussi sur la rétention préférentielle et sélective de l'agent photosensible dans les cellules anormales ou hyperprolifératives. Les études antérieurement faites dans notre laboratoire ont rapporté que les cellules T humaines activées et exprimant le récepteur à l'IL-2 de haute affinité (CD25) démontrent une rétention accrue du TH9402 et sont éliminées préférentiellement par la PDT. De façon similaire, nous observons dans le présent travail que les cellules T murines activées et exprimant le marqueur d'activation CD44 (T CD44<sup>hi</sup>) montrent une incorporation et une rétention du TH9402 supérieures à celles observées chez les cellules T non activées (T CD44<sup>lo</sup>). Il n'est donc pas surprenant d'observer que la PDT élimine près de 98 % des lymphocytes T CD4 et CD8 activées exprimant le marqueur d'activation CD44 ou CD25 (Fig. 1 et 2), tandis qu'elle préserve 40% des CD4 et 67 % des CD8 non activés (Fig. 4).

Les lymphocytes T, qu'ils soient CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, et les cellules NK activées à la Con A 48 heures sont particulièrement sensibles à la PDT. Toutefois, les cellules NK semblent être éliminées plus tôt soit dans les premières heures (1h et 4h) suivant le traitement en comparaison avec les lymphocytes T activées. Malgré cela, tous les types cellulaires ciblés sont majoritairement éliminés à 24h suivant le traitement.

L'impact de la PDT sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> quiescents s'avère moins important que contre les T cellules activées. De plus, on démontre un effet plus important de mort cellulaire induite par la PDT sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par rapport aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pour les cellules non activées. Cette dernière observation n'a cependant pas été mise en évidence pour les cellules activées. Ceci est probablement dû à la grande sensibilité à la PDT des deux types de cellules activées.

La rétention sélective de l'agent photosensibilisateur est rapportée dans quelques études utilisant une autre molécule photosensible, le dérivé benzoporphyrine-monoacid A (BPD-MA "benzoporphyrin monoacid ring A"). La rétention du BPD-MA dans les cellules T activées avec un anticorps anti-CD3 est 2.5 fois supérieure à celle observée dans les cellules T fraîchement prélevées.<sup>116</sup> D'autres études utilisant aussi le BPD-MA montrent également que les cellules T activées par un mitogène ou les cellules tumorales incorporent 5 à 10 fois plus de BPD-MA que les cellules spléniques non activées.<sup>5,117</sup> De même, les lymphocytes T activés exprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) retiennent de façon beaucoup plus efficace l'agent photosensible que les lymphocytes T non activés.<sup>5,73,117</sup> Il est cependant intéressant de noter que le BPD-MA est un agent à localisation principalement membranaire alors que le TH9402 se localise surtout au niveau de la mitochondrie. Ces différentes caractéristiques de localisation indiquant donc que la spécificité de certains photosensibilisateurs pour les cellules T activées peut dépendre de facteurs cellulaires distincts. Or l'élucidation de ces mécanismes de rétention pourrait être intéressante à l'optimisation des interventions thérapeutiques.

## 2.2. Élimination des cellules B et NK par la PDT

Les lymphocytes B sont très sensibles aux conditions de PDT utilisées dans cette étude, la majorité meurent dans les premières heures suivant le traitement. (Fig. 5) Ainsi, 93.5% de mortalité est observée chez les lymphocytes B à 1h post-PDT. Cette élimination augmente avec le temps pour atteindre 99 % à 24h par rapport à l'échantillon non traité. Le fait d'éliminer les cellules B du greffon représente un avantage lors d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) puisque les cellules dendritiques ou B du receveur sont accessoires dans la maladie de GVH . En effet, les cellules B étant des cellules présentatrices d'antigènes, leur élimination prévient la présentation croisée des antigènes du receveur et donc diminue les risques de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Aussi, le fait d'éradiquer les cellules produisant des anticorps contre l'hôte pourrait agir sur la phase effectrice de la GVHD, particulièrement dans sa forme chronique où les mécanismes d'autoimmunité sont prédominants. D'ailleurs, une étude de Miklos *et al* indique que la présence d'anticorps contre les antigènes H-Y (antigènes d'histocompatibilité encodés par le chromosome Y) corrèle avec le développement de GVHD chronique. Conséquemment, les cellules B pourraient être une nouvelle cible afin de prévenir immunologiquement la GVHD chronique.<sup>118</sup> De façon notable, le traitement avec des Ac anti-CD20 par voie intraveineuse chez les sujets atteints de maladies auto-immunes amène des réponses cliniques.

Les cellules NK au repos sont un peu plus résistantes au traitement que les cellules B avec dans les mêmes conditions de que les cellules B. (Fig. 5) On constate qu'une heure après le traitement, la viabilité des cellules NK est encore importante ; seulement 37 % des cellules NK sont éliminés par rapport au contrôle. Mais la perte de ces cellules augmente significativement comparativement aux cellules non traitées pour atteindre 89% à 4h et à 24h post-PDT.

L'élimination des cellules NK dans un greffon permet de diminuer les cellules effectrices qui pourraient réagir contre l'hôte lors d'une greffe de CSH. Par contre, les cellules NK ont une activité anti-leucémique et anti-virale qui n'est pas à négliger. Dans le cas de leur activité anti-virale, elle se limite toutefois aux virus de la famille herpès.

Puisque les lymphocytes B sont les plus endommagés parmi les splénocytes quiescents, on pourrait penser que les cellules B incorporent plus de TH9402 que les cellules T. Les cellules B pourraient présenter moins de Pgp que les cellules T, ce qui n'est pas le cas chez l'humain. En effet, les études faites sur l'expression de la Pgp dans les lymphocytes T humains démontrent que les cellules B humaines expriment moins de Pgp que les lymphocytes T.<sup>119</sup> Dans le mécanisme d'augmentation de toxicité contre les cellules B, l'élimination rapide et profonde des cellules B pourrait être due à une localisation cellulaire différente du TH9402 entre les lymphocytes T et B. Pour répondre à cette question, il faudrait évaluer la distribution intracellulaire du TH9402 par microscopie à fluorescence sur ces deux populations de lymphocytes. Les cellules NK humaines expriment le plus de Pgp parmi les lymphocytes (autant de Pgp que les cellules CD8).<sup>120,121</sup> Il faudrait donc vérifier le niveau de rétention de TH9402 ainsi que l'expression et la fonctionnalité de la Pgp dans les cellules NK murines.

### 2.3. Effet de la PDT sur les cellules T régulatrices

Le développement et l'intensité de la maladie GVH ne dépendent pas seulement de la présence de lymphocytes T réagissant aux alloantigènes mais aussi de la quantité et de l'activité des cellules T régulatrices. Conséquemment, une étude concernant l'effet de la PDT sur les cellules T régulatrices a été initiée.

Des études récentes montrent que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> humaine, prélevées à partir du sang périphérique normal suppriment l'alloréactivité des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> *in vitro* induite par une MLR.<sup>95,122</sup> Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules murines dans le cas d'une disparité partielle entre les cellules stimulatrices et les cellules effectrices.<sup>123</sup> Pour étudier l'effet suppressif de ces cellules dans le cas d'un système HLA incompatible (disparité totale au niveau du CMH de classe I et II), nous avons analysé, *in vitro*, la capacité des cellules de rates fraîches CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de souris B6 (H-2b) à supprimer la prolifération des cellules syngéniques CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en présence des cellules stimulatrices allogéniques C3H (H-2k) par MLR.

Lorsque les cellules T régulatrices furent exposées aux mêmes conditions de PDT qui ont permis une élimination de 98% des cellules T alloréactives (Fig. 1 et 2), leur activité fut préservée pour les ratios 1 : 1 et 2 : 1 (effectrices : régulatrices). (Fig.10). Ceci indiquent que la prévention, ou l'élimination, voulue de la maladie GVH par la PDT

peut être obtenue dans ces conditions du traitement qui permettent d'éliminer les cellules T activées (alloréactives) et de préserver les cellules T régulatrices. Cette observation est importante car les cellules T régulatrices sont essentielles dans l'induction de la tolérance aux alloantigènes.<sup>124-127</sup>

Ces résultats démontrent que la PDT épargne des cellules T reg qui pourraient aussi contribuer à prévenir le développement de la GVHD. Nous avons néanmoins observé une diminution du nombre de cellules T reg par le PDT puisque l'inhibition de l'alloréactivité était moins importante aux ratios 4 : 1 et 8 : 1. Malgré tout, l'effet sur les Treg semble relativement mineur puisque les Treg qui persistent démontrent une activité inhibitrice face au contrôle sans Treg. Notons qu'il n'est pas surprenant d'observer une légère cytotoxicité contre les Treg puisque les cellules T au repos sont aussi affectées par la PDT. Ce faible degré de cytotoxicité est attribuable aux conditions de PDT qui sont très sévères dans le but d'éliminer les cellules T activées qui pourraient exercer une activité GVH très importante dans un contexte de greffe avec incompatibilité complète au niveau du CMH. Il serait intéressant de vérifier si des conditions de PDT moins sévères pourraient être utilisées pour prévenir la GVH dans un contexte d'incompatibilité partielle au niveau du CMH ou encore d'histocompatibilité limitée aux antigènes mineurs et de déterminer si ces conditions pourraient épargner complètement les T régulatrices.

Pour déterminer si la spécificité de la thérapie photodynamique se reflète dans la capacité des cellules T activées à accumuler préférentiellement de faibles doses du TH9402, nous avons mesuré la cinétique d'incorporation du TH9402 dans les lymphocytes activés et au repos. La deuxième partie du projet a été consacrée à l'optimisation de la thérapie photodynamique. Nous avons évalué l'effet de faibles doses de TH9402 (0.5 à 2  $\mu$ M) mais sans la période d'extrusion sur l'élimination des cellules T activées et ceci afin d'augmenter la simplicité du traitement, de permettre une meilleure sélectivité du traitement et d'éliminer le maximum de cellules T activées par apoptose.

Les résultats obtenus dans cette partie du projet effectuée avec de faibles doses de TH9402 ont permis de démontrer qu'il est possible de cibler efficacement les lymphocytes T activés mais toujours au dépend des cellules T au repos. La période d'efflux semble indispensable pour induire une déplétion préférentielle des lymphocytes T activés. De plus, sans la période d'efflux précédant le traitement, nous n'avons pu



décélérer un effet important de mort cellulaire par apoptose (Ann<sup>7</sup>-AAD<sup>7</sup>) dans les cellules T activées. Néanmoins nous avons démontré que la PDT préserve des cellules T régulatrices qui pourraient jouer un rôle majeur dans la prévention et le traitement de maladie du greffon contre l'hôte.

Dans des investigations futures, les efforts seront ciblés sur l'identification des conditions du traitement photodynamique qui permettront une élimination maximale des lymphocytes T alloréactifs tout en préservant le plus possible de cellules T régulatrices.

### 3. La méthodologie de PDT pourrait-elle permettre de non seulement de prévenir mais aussi de traiter la GVHD?

Selon nos résultats, la PDT nous permettrait d'éliminer presque totalement les lymphocytes T activés (CD4 et CD8 présentant soit CD44 ou CD25) qui pourraient engendrer une réponse immunitaire contre l'hôte et donc d'initier la GVHD. Elle permettrait aussi de conserver une proportion considérable de lymphocytes T CD4 et CD8 quiescents responsables de l'immunité anti-tumorale et anti-infectieuse. La PDT avec le TH9402 a donc été évaluée dans un contexte de prévention de la GVHD. Cependant, de telles propriétés pourraient-elles être utilisées avantageusement dans le contexte du traitement de la GVHD?

La photophérèse extracorporelle (PCE) est une approche de traitement utilisant le 8-methoxypsoralen (8-MOP) comme agent photosensible. Cette stratégie s'est révélée efficace dans le traitement de la GVHD et de maladies autoimmunes. Dans le cadre des maladies autoimmunes, le traitement des cellules collectées par leucophérèse montre une augmentation du pourcentage des cellules mortes (presque 70 % des leucocytes sont éliminés).<sup>74</sup> Dans le cadre de notre étude, nous avons investigué de façon plus approfondie l'évaluation de l'effet de la PDT sur les lymphocytes T activés. L'élimination de presque la totalité des cellules T activées par le TH9402 est donc beaucoup plus importante que l'effet rapporté avec le 8-MOP. La PDT avec le TH9402 pourrait donc représenter une stratégie attrayante pour le traitement de diverses conditions auto-immunes et allo-immunes.

En plus de l'effet cytotoxique important du TH9402, sa sélectivité pour les cellules T activées constitue un avantage dans le cadre de son application au traitement de la

GVHD, puisqu'elle devrait permettre d'éliminer spécifiquement les cellules T alloréactives dirigées contre les tissus de l'hôte. De plus, l'élimination intensive et immédiate des cellules B circulantes avec le TH9402 élimine ainsi une partie du pool de cellules présentatrices d'antigène qui initient ou maintiennent la réaction immunologique GVH.<sup>128</sup>

Les études réalisées avec le 8-MOP montrent que le traitement des patients atteints de GVHD chronique par photophérèse extracorporelle provoque une diminution dans le sang de 50 % des cellules dendritiques (CD80<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>).<sup>75</sup> De plus, la diminution des cellules dendritiques chez les patients traités inhibe de 84 % la prolifération des lymphocytes T activés par réaction mixte lymphocytaire.<sup>76</sup>

Dans notre étude il serait intéressant d'évaluer l'effet de la PDT avec le TH9402 sur les cellules dendritiques. Néanmoins l'éradication des lymphocytes T activés, couplée à l'élimination des cellules B et NK, cellules toutes potentiellement impliquées dans les mécanismes physiopathologiques de la GVHD rendent la PDT avec le TH9402 particulièrement prometteuse dans une approche de photophérèse.

#### 4. Mécanisme d'action de la thérapie photodynamique *ex vivo* : effet immunomodulateur *in vivo*.

Les expérimentations qui consistent à traiter les lymphocytes T par la photophérèse extracorporelle utilisant le 8-MOP et les UVA suggèrent que la photophérèse extracorporelle induit une réaction immunitaire contre les cellules T cancéreuses ou alloréactives malgré qu'elle ne traite qu'une partie des lymphocytes T circulantes.<sup>75,76,129</sup>

Dans le cas de la GVHD, il a été suggéré que l'effet immunomodulateur de la PDT résulte de l'induction d'une tolérance immunologique. La tolérance peut être due à plusieurs mécanismes incluant l'anergie, la délétion, l'ignorance et la suppression. La suppression est le mécanisme proposé. En effet, les cellules endommagées par la PDT seront phagocytées par les cellules dendritiques matures. Ces dernières présentent alors les antigènes provenant des cellules endommagées, via le CMH au TCR des cellules T régulatrices qui à leur tour induisent la suppression des cellules T effectrices résiduelles. Cette réponse immune anti-clone T pathogène est à la base de la thérapie de "vaccination T".

##### 4.1. Importance de l'apoptose.

Une cellule apoptotique est moins endommagée qu'une cellule nécrotique, ce qui, selon certaines études, rend la présentation des récepteurs cellulaires T (TCR) par les cellules dendritiques plus efficace. D'ailleurs, plusieurs études impliquent l'apoptose comme mécanisme d'action prédominant de la PDT, que ce soit dans les lymphomes T cutanés<sup>77</sup> ou la GVHD.<sup>75,76,129</sup> Le fait que la thérapie photodynamique avec le TH9402 induit l'apoptose uniquement dans les cellules T activées met en relief une particularité qui pourrait rehausser son rôle immunomodulateur *in vivo*.

Des études effectuées en 2001 rapportent d'ailleurs que l'infusion de leucocytes apoptotiques améliore la qualité de la greffe de moelle osseuse et facilite la transplantation de façon non spécifique donc indépendamment de l'origine des cellules apoptotiques (donneur, receveur, xénogénique ou de tiers).<sup>130</sup>

## 5. Rétention préférentielle du TH9402

### 5.1. À quoi pourrait être due la rétention préférentielle du TH9402 et quelle est l'implication de la glycoprotéine-P (Pgp)?

La Pgp, le produit du gène "multidrug resistance-1" (MDR-1), est une pompe d'efflux transmembranaire dépendante de l'ATP. Les Pgp sont impliquées dans le transport de plusieurs composés lipophiles incluant plusieurs médicaments de chimiothérapie (anthracyclines, vincristine...), d'où son rôle majeur dans la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie.<sup>131,132</sup> Elles sont exprimées à la surface des cellules souches normales, et aussi à la surface des lymphocytes.<sup>133</sup> Les Pgp sont aussi impliquées dans le transport de certaines molécules photosensibles telles que la rhodamine-123. Il a été démontré que la rhodamine-123 est incorporée dans toutes les cellules mais est éliminée de la cellule à travers la Pgp.<sup>134</sup> Puisque l'activation des cellules T pourrait mener à l'inactivation de la Pgp<sup>73</sup>, et étant donné la similarité structurale entre la rhodamine 123 et le 4,5 dibromorhodamine méthyl ester (TH9402), l'activation des cellules T pourrait limiter l'extrusion du TH9402 à travers les Pgp.

Dans notre laboratoire, Guimond et al<sup>73</sup> ont démontré que l'inactivation de la Pgp par la cyclosporine-A résulte en une rétention accrue du TH9402 dans les cellules T au repos, tandis qu'elle n'exerce aucun effet sur les cellules T activées. Donc cette étude a démontré que la PDT avec le TH9402 prend avantage de la modulation de la Pgp pour cibler sélectivement les cellules T qui inactivent leur Pgp avec l'activation cellulaire.

### 5.2. Est-ce que cela s'applique aux cellules T murines ?

Il a été démontré que l'élimination de la rhodamine-123 des lymphocytes T murins est médiée par la Pgp, et que les cellules CD8 expulsent de façon efficace la rhodamine par la Pgp.<sup>135</sup> D'autres études rapportent que l'activité de la Pgp dans les cellules CD8 est plus importante que dans les CD4 de souris. Ceci est en accord avec le fait que la PDT préserve plus de lymphocytes CD8+ que CD4+.<sup>136</sup>

Des essais dans notre laboratoire montrent qu'après avoir bloqué la Pgp avec le verapamil (inhibiteur chimique de la Pgp par blocage des pompes à calcium) les cellules T activées et non activées incorporent toutes les deux plus de TH9402. Ceci suggère que

la modulation de la Pgp ne soit pas la cause unique de la rétention préférentielle de l'agent photosensibilisateur.

### **5.3. À quoi pourrait être due la rétention préférentielle du TH9402 et quel est le rôle probable des mitochondries?**

On sait que la localisation des agents photosensibles dans les mitochondries se fait grâce à des interactions spécifiques entre des protéines ou des lipides, ou grâce à leur charge (molécules cationiques) comme la rhodamine-123. La majorité des agents photosensibles cationiques sont utilisés dans le traitement des cancers car ils se localisent préférentiellement dans les cellules tumorales comparativement aux cellules normales. Ceci est dû en partie au nombre élevé de mitochondries présentes dans les cellules ayant un cycle cellulaire rapide<sup>137</sup> et un potentiel transmembranaire augmenté.<sup>138</sup>

En effet, la rétention préférentielle et accrue du TH9402 dans les cellules T activées pourrait être expliquée par le fait que dans les cellules T activées, le métabolisme cellulaire augmente de même que l'activité mitochondriale. Il semble d'ailleurs que l'activation des cellules T favorise une incorporation accrue de la rhodamine-123. Il n'est donc pas surprenant d'observer une localisation mitochondriale abondante avec le dérivé dibromorhodamine (TH9402).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La thérapie photodynamique est une thérapie dont l'application clinique est relativement récente. Bien qu'elle se soit révélée efficace pour le traitement de certaines conditions malignes et immunologiques, cette stratégie pourrait bénéficier du développement de nouveaux agents photosensibilisateurs plus puissants. La dibromorhodamine ou TH9402 représente un atout de poids car il induit une cytotoxicité importante contre les cellules malignes et les cellules T activées. Les travaux effectués dans le cadre du présent travail de maîtrise ont permis d'identifier la nature des cellules affectées par la PDT et de caractériser les paramètres de mort cellulaire.

Nos travaux ont démontré que la PDT avec le TH9402 élimine les lymphocytes T activés et préserve une majorité de cellules T au repos. Ce traitement éradique aussi les lymphocytes B, même au repos, de façon extrêmement rapide et complète. De même un nombre important de cellules NK sont éliminées. Les mécanismes de mort cellulaire impliquent surtout des voies nécrotiques, sauf pour les lymphocytes T activés qui démontrent l'ajout de phénomènes apoptotiques.

Nos travaux avec de faibles doses de TH9402 ont permis de démontrer qu'il est possible de cibler efficacement les lymphocytes T activés. Cependant il ne nous a pas été possible d'identifier des conditions qui permettaient de séparer cet effet de celui contre les cellules T au repos. Néanmoins nous avons démontré que la PDT préserve des cellules T régulatrices qui pourraient jouer un rôle majeur dans la prévention et le traitement de maladie du greffon contre l'hôte.

Dans des études futures, une GVHD pourrait être induite dans des animaux et des cellules de ces derniers traitées par PDT et infusées de façon à déterminer l'impact thérapeutique de ces cellules dans une approche de photophérèse extracorporelle. De plus, les conditions de PDT pourraient être optimisées afin de soit rehausser la concentration en cellules T régulatrices soit favoriser une stratégie de vaccination anti-lymphocyte T. Il sera aussi intéressant de déterminer les mécanismes de cytotoxicité qui sous-tendent l'élimination des différentes populations cellulaires puisque nous avons clairement observé que le niveau de rétention de TH9402 n'est pas le seul facteur impliqué. L'étude de la biodistribution intracellulaire du TH9402 et des impacts sur les différentes organelles pourrait aider à mieux prendre avantage de ce nouvel agent

photosensibilisateur. Aussi l'étude du rôle des différentes populations ciblées par la PDT, dont les cellules B, dans la GVHD permettra de mieux cerner sa physiopathologie et orienter son traitement.

Les patients atteints de maladies auto-immunes pourraient bénéficier de ce nouvel agent photosensibilisateur. L'utilisation du TH9402 pourrait être une stratégie thérapeutique fort intéressante de ce type de maladies puisqu'il a été démontré par la présente étude que la PDT avec le TH9402 élimine les lymphocytes T activés et éradique aussi les lymphocytes B, même au repos, de façon extrêmement rapide et complète. Or ces deux populations lymphocytaires sont les principales responsables de la physiopathologie des maladies auto-immunes.

Soit la photophérèse extracorporelle avec le TH9402, soit le traitement de greffons lors de procédures de purge *ex vivo* des autogreffes, devraient permettre d'éliminer les cellules auto-réactives présentes *in vivo* ou contaminant le greffon chez des sujets atteint de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, et la sclérose en plaques. Aussi la préservation des lymphocytes T régulateurs par la PDT représente un atout majeur afin d'exercer un contrôle actif sur ces différentes maladies causées par une dérégulation immune.

Finalement, nos différents travaux ont permis de rehausser la versatilité de la PDT. En effet, en modifiant les concentrations de colorant, la durée d'incubation, la durée de l'efflux cellulaire et l'intensité d'illumination, il est possible d'obtenir des profils d'activité qui sont différents et de préserver les populations cellulaires désirées. Dans ce contexte, la thérapie photodynamique représente une approche à la fois efficace et conviviale qui sera un atout majeur pour de nouveaux développements en thérapie cellulaire.

## Reference List

- (1) Khan SA, Dougherty TJ, Mang TS. An evaluation of photodynamic therapy in the management of cutaneous metastases of breast cancer. *Eur J Cancer*. 1993;29A:1686-1690.
- (2) Lui H, Anderson RR. Photodynamic therapy in dermatology: recent developments. *Dermatol Clin*. 1993;11:1-13.
- (3) Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:443-456.
- (4) Ben Hur E, Rywkin S, Rosenthal I, Geacintov NE, Horowitz B. Virus inactivation in red cell concentrates by photosensitization with phthalocyanines: protection of red cells but not of vesicular stomatitis virus with a water-soluble analogue of vitamin E. *Transfusion*. 1995;35:401-406.
- (5) Levy JG. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin Oncol*. 1994;21:4-10.
- (6) Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992;55:145-157.
- (7) Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res*. 1976;36:2326-2329.
- (8) Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219:1-14.
- (9) Henderson BW, Bellnier DA, Greco WR et al. An in vivo quantitative structure-activity relationship for a congeneric series of pyropheophorbide derivatives as photosensitizers for photodynamic therapy. *Cancer Res*. 1997;57:4000-4007.
- (10) Dummin H, Cernay T, Zimmermann HW. Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn (II) phthalocyanines with lipophilic side-chains. *J Photochem Photobiol B*. 1997;37:219-229.
- (11) Kessel D, Woodburn K, Henderson BW, Chang CK. Sites of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol*. 1995;62:875-881.
- (12) Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol*. 1996;64:182-187.
- (13) Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochem Photobiol*. 1997;66:479-483.
- (14) He XY, Sikes RA, Thomsen S, Chung LW, Jacques SL. Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem Photobiol*. 1994;59:468-473.



- (15) Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM. Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br J Cancer*. 1996;74:22-29.
- (16) Laukka MA, Wang KK, Bonner JA. Apoptosis occurs in lymphoma cells but not in hepatoma cells following ionizing radiation and photodynamic therapy. *Dig Dis Sci*. 1994;39:2467-2475.
- (17) Woodburn KW, Vardaxis NJ, Hill JS, Kaye AH, Phillips DR. Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem Photobiol*. 1991;54:725-732.
- (18) Agarwal ML, Larkin HE, Zaidi SI, Mukhtar H, Oleinick NL. Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer Res*. 1993;53:5897-5902.
- (19) Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM. Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. *Br J Cancer*. 1999;79:72-81.
- (20) Wood SR, Holroyd JA, Brown SB. The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *Photochem Photobiol*. 1997;65:397-402.
- (21) Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1:837-840.
- (22) Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3:721-729.
- (23) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
- (24) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-776.
- (25) Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 2002;9:505-512.
- (26) Granville DJ, Carthy CM, Jiang H et al. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. *FEBS Lett*. 1998;437:5-10.
- (27) Varnes ME, Chiu SM, Xue LY, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;255:673-679.
- (28) Kessel D, Luo Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6:28-35.

- (29) Grebenova D, Kuzelova K, Smetana K et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*. 2003;69:71-85.
- (30) Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol*. 2000;115:1041-1046.
- (31) Srivastava M, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276:15481-15488.
- (32) Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, Yu JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol*. 2003;194:363-375.
- (33) Fabris C, Valduga G, Miotto G et al. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res*. 2001;61:7495-7500.
- (34) Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1:837-840.
- (35) Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1:1-21.
- (36) Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20:3-7.
- (37) Storek J, Dawson MA, Storer B et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97:3380-3389.
- (38) Hill GR, Crawford JM, Cooke KR et al. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. 1997;90:3204-3213.
- (39) Maury S, Mary JY, Rabian C et al. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br J Haematol*. 2001;115:630-641.
- (40) Kulkarni S, Powles R, Treleaven J et al. Chronic graft versus host disease is associated with long-term risk for pneumococcal infections in recipients of bone marrow transplants. *Blood*. 2000;95:3683-3686.
- (41) BARNES DW, CORP MJ, LOUTIT JF, NEAL FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J*. 1956;32:626-627.

- (42) Nash RA, Antin JH, Karanes C et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2000;96:2062-2068.
- (43) Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92:2303-2314.
- (44) Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:121-129.
- (45) Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*. 2000;95:3702-3709.
- (46) BILLINGHAM RE, BRENT L. A simple method for inducing tolerance of skin homografts in mice. *Transplant Bull*. 1957;4:67-71.
- (47) Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood*. 1994;83:2360-2367.
- (48) Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL et al. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol*. 1991;146:592-598.
- (49) June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*. 1994;15:321-331.
- (50) Yang Y, Wilson JM. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science*. 1996;273:1862-1864.
- (51) Miyamoto T, Akashi K, Hayashi S et al. Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17:185-190.
- (52) Wang MG, Szebeni J, Pearson DA, Szot GL, Sykes M. Inhibition of graft-versus-host disease by interleukin-2 treatment is associated with altered cytokine production by expanded graft-versus-host-reactive CD4+ helper cells. *Transplantation*. 1995;60:481-490.
- (53) Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 1992;175:405-413.

- (54) Luger TA, Schwarz T. Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol.* 1990;95:100S-104S.
- (55) Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol.* 1988;141:2629-2634.
- (56) Langrehr JM, Murase N, Markus PM et al. Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat. *J Clin Invest.* 1992;90:679-683.
- (57) Edelson R, Berger C, Gasparro F et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med.* 1987;316:297-303.
- (58) Duvic M, Hester JP, Lemak NA. Photopheresis therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35:573-579.
- (59) Jiang SB, Dietz SB, Kim M, Lim HW. Extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T-cell lymphoma: a 9.7-year experience. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1999;15:161-165.
- (60) Dragieva G, Scharer L, Dummer R, Kempf W. Photodynamic therapy--a new treatment option for epithelial malignancies of the skin. *Onkologie.* 2004;27:407-411.
- (61) Bisland SK, Lilge L, Lin A, Rusnov R, Wilson BC. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem Photobiol.* 2004;80:22-30.
- (62) Freitag L, Ernst A, Thomas M et al. Sequential photodynamic therapy (PDT) and high dose brachytherapy for endobronchial tumour control in patients with limited bronchogenic carcinoma. *Thorax.* 2004;59:790-793.
- (63) Mitton D, Ackroyd R. Photodynamic therapy in oesophageal carcinoma: an overview. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:839-850.
- (64) Enomoto DN, Mekkes JR, Bossuyt PM et al. Treatment of patients with systemic sclerosis with extracorporeal photochemotherapy (photopheresis). *J Am Acad Dermatol.* 1999;41:915-922.
- (65) Hilliquin P, Andreu G, Heshmati F, Menkes CJ. [Treatment of refractory rheumatoid polyarthritis by extracorporeal photochemotherapy]. *Rev Rhum Ed Fr.* 1993;60:125-130.
- (66) Knobler RM, Graninger W, Graninger W et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of systemic lupus erythematosus. A pilot study. *Arthritis Rheum.* 1992;35:319-324.
- (67) Kenneth FB, Denis Claude Roy. The role of tumor cell purging in autologous hematopoietic stem cell transplantation for malignant disease: laboratory basis and clinical results. *Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation.* 2004;262-276.

- (68) Dallaire N, Leonard B, Moreau B. Preferential eradication of B-lineage lymphoma cells over T cells using TH9402 photodynamic cell therapy, and hierarchical preservation of myeloid and erythroid progenitors. *Blood*. 2001;98:391a.
- (69) Roy DC, Boileau J, Laplante J. Phase I study in autologous progenitor cell transplantation purged with a photodynamic approach for patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:2504.
- (70) Villeneuve L. Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukaemia and other neoplasias with rhodamine derivatives. *Biotechnol Appl Biochem*. 1999;30 ( Pt 1):1-17.
- (71) Barr ML, Meiser BM, Eisen HJ et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. Photopheresis Transplantation Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339:1744-1751.
- (72) Greinix HT, Volc-Platzer B, Kalhs P et al. Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood*. 2000;96:2426-2431.
- (73) Guimond M, Balassy A, Barrette M et al. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood*. 2002;100:375-382.
- (74) Enomoto DN, Schellekens PT, Yong SL et al. Extracorporeal photochemotherapy (photopheresis) induces apoptosis in lymphocytes: a possible mechanism of action of PUVA therapy. *Photochem Photobiol*. 1997;65:177-180.
- (75) Alcindor T, Gorgun G, Miller KB et al. Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2001;98:1622-1625.
- (76) Gorgun G, Miller KB, Foss FM. Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2002;100:941-947.
- (77) Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, Gasparro FP, Vowels BR. Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol*. 1996;107:235-242.
- (78) Berger CL, Xu AL, Hanlon D et al. Induction of human tumor-loaded dendritic cells. *Int J Cancer*. 2001;91:438-447.
- (79) Roy DC, Tantravahi R, Murray C et al. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. *Blood*. 1990;75:296-304.
- (80) Roy DC, Beauger N, Gyger M. Bone Marrow Purging and Stem Cell Preparation. In: Matzku, S, Stahel, R A (eds): *Antibodies in Diagnosis and Therapy : Technologies, Mechanisms, and Clinical Data*, Harwood Academy. 1999;255-304.

- (81) Beauger N, Roy DC. Hematopoietic Progenitor-Cell Graft Processing and Treatment. In: Grossbard, M L (ed): Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer, Marcel Dekker Inc. 1998;229-280.
- (82) Aversa F, Tabilio A, Velardi A et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998;339:1186-1193.
- (83) Champlin R. T-cell depletion to prevent graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990;4:687-698.
- (84) Champlin RE, Passweg JR, Zhang MJ et al. T-cell depletion of bone marrow transplants for leukemia from donors other than HLA-identical siblings: advantage of T-cell antibodies with narrow specificities. *Blood*. 2000;95:3996-4003.
- (85) Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G et al. Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet*. 1984;1:472-476.
- (86) Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood*. 2001;98:1358-1364.
- (87) Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P et al. The number of donor CD3(+) cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood*. 2001;97:383-387.
- (88) Soiffer RJ, Bosserman L, Murray C et al. Reconstitution of T-cell function after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75:2076-2084.
- (89) Roux E, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. T-cell repertoire complexity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum Immunol*. 1996;48:135-138.
- (90) Asai O, Longo DL, Tian ZG et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1998;101:1835-1842.
- (91) Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol*. 2002;169:2461-2465.
- (92) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299:1057-1061.
- (93) Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188:287-296.

- (94) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-1164.
- (95) Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 2001;193:1295-1302.
- (96) Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12:431-440.
- (97) Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2002;196:401-406.
- (98) Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002;196:389-399.
- (99) Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* 2002;99:3493-3499.
- (100) Champlin R, Ho W, Gajewski J et al. Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;76:418-423.
- (101) Soiffer RJ, Weller E, Alyea EP et al. CD6+ donor marrow T-cell depletion as the sole form of graft-versus-host disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic bone marrow transplant from unrelated donors. *J Clin Oncol.* 2001;19:1152-1159.
- (102) Soiffer RJ, Fairclough D, Robertson M et al. CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission. *Blood.* 1997;89:3039-3047.
- (103) Alyea E, Weller E, Schlossman R et al. T-cell--depleted allogeneic bone marrow transplantation followed by donor lymphocyte infusion in patients with multiple myeloma: induction of graft-versus-myeloma effect. *Blood.* 2001;98:934-939.
- (104) Koh MB, Prentice HG, Lowdell MW. Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: graft engineering for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:1071-1079.
- (105) Montagna D, Yvon E, Calcaterra V et al. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood.* 1999;93:3550-3557.

- (106) Fehse B, Frerk O, Goldmann M, Bulduk M, Zander AR. Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69). *Br J Haematol.* 2000;109:644-651.
- (107) Mavroudis DA, Jiang YZ, Hensel N et al. Specific depletion of alloreactivity against haplotype mismatched related individuals by a recombinant immunotoxin: a new approach to graft-versus-host disease prophylaxis in haploidentical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17:793-799.
- (108) Garderet L, Snell V, Przepiorka D et al. Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell preparations. *Transplantation.* 1999;67:124-130.
- (109) Lightdale CJ. Role of photodynamic therapy in the management of advanced esophageal cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2000;10:397-408.
- (110) Pal P, Zeng H, Durocher G et al. Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochem Photobiol.* 1996;63:161-168.
- (111) Roy DC, Paquette Y, Balassy A et al. Elimination of chronic myeloid leukemia cells with a novel photodynamic treatment. *Blood.* 1999;94:144a.
- (112) Roy DC, Dallaire N, Kros G et al. Normal and neoplastic B cells are unduly susceptible to photodynamic cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9:115.
- (113) Roy DC, Boileau J, Laplante J et al. Phase I study of autologous progenitor cell transplantation purged with a photodynamic approach for patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96:583a.
- (114) Boumédine R, Roy DC. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy.* 2005;7:1-10.
- (115) Sidi boumédine R, Kros G, Perreault C, Roy DC. Specific elimination of alloreactive T cells lymphocytes using TH9402-based photodynamic cell therapy. manuscript en préparation. 2003.
- (116) Hunt DW, Jiang H, Granville DJ et al. Consequences of the photodynamic treatment of resting and activated peripheral T lymphocytes. *Immunopharmacology.* 1999;41:31-44.
- (117) Richter AM, Jain AK, Obochi M et al. Activation of benzoporphyrin derivative in the circulation of mice without skin photosensitivity. *Photochem Photobiol.* 1994;59:350-355.
- (118) Miklos DB, Kim HT, Miller KH et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood.* 2005;105:2973-2978.
- (119) Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood.* 1994;83:2451-2458.



- (120) Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood*. 1992;80:2735-2739.
- (121) Ludescher C, Pall G, Irschick EU, Gastl G. Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *Br J Haematol*. 1998;101:722-727.
- (122) Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M et al. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 2001;193:1285-1294.
- (123) Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med*. 2001;193:1311-1318.
- (124) Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood*. 2004;104:3804-3812.
- (125) Hanash AM, Levy RB. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2005;105:1828-1836.
- (126) Colson YL, Christopher K, Glickman J et al. Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. *Blood*. 2004;104:3829-3835.
- (127) Ermann J, Hoffmann P, Edinger M et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*. 2005;105:2220-2226.
- (128) Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res*. 2003;63:2836-2843.
- (129) Foss FM, Gorgun G, Miller KB. Extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:719-725.
- (130) Bittencourt MC, Perruche S, Contassot E et al. Intravenous injection of apoptotic leukocytes enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. *Blood*. 2001;98:224-230.
- (131) Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res*. 1993;53:747-754.
- (132) Ling V. Charles F. Kettering Prize. P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs. *Cancer*. 1992;69:2603-2609.
- (133) Pilarski LM, Paine D, McElhaney JE, Cass CE, Belch AR. Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. *Am J Hematol*. 1995;49:323-335.

- (134) Weaver JL, Pine PS, Aszalos A et al. Laser scanning and confocal microscopy of daunorubicin, doxorubicin, and rhodamine 123 in multidrug-resistant cells. *Exp Cell Res.* 1991;196:323-329.
- (135) MacDonald HR, Bommhardt U, Cerottini JC. Developmentally regulated expression of P-glycoprotein (multidrug resistance) activity in mouse thymocytes. *Eur J Immunol.* 1995;25:1457-1460.
- (136) Bommhardt U, Cerottini JC, MacDonald HR. Heterogeneity in P-glycoprotein (multidrug resistance) activity among murine peripheral T cells: correlation with surface phenotype and effector function. *Eur J Immunol.* 1994;24:2974-2981.
- (137) Leprat P, Ratinaud MH, Maftah A, Petit JM, Julien R. Use of nonyl acridine orange and rhodamine 123 to follow biosynthesis and functional assembly of mitochondrial membrane during L1210 cell cycle. *Exp Cell Res.* 1990;186:130-137.
- (138) Davis S, Weiss MJ, Wong JR, Lampidis TJ, Chen LB. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 1985;260:13844-13850.